

Andreia Patrícia da Silva Oliveira

***Ficus carica* L.: Estudo fitoquímico, biológico e molecular**

Tese de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas

Especialidade de Fitoquímica e Farmacognosia

Trabalho realizado sob orientação da

Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade

e co-orientação de

**Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão e
Professora Doutora Branca Maria Cardoso Monteiro da Silva**

Setembro de 2012

Aos meus pais

Trabalho apoiado financeiramente através da atribuição de uma bolsa de doutoramento (SFRH/BD/47620/2008) pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do POPH – QREN – Tipologia 4.1 – Formação Avançada, comparticipado pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.



É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO QUE A TAL SE COMPROMETE.

PUBLICAÇÕES

Fazem parte integrante desta dissertação os seguintes trabalhos:

Publicações em revistas referenciadas no Journal Citation Reports da ISI Web of Knowledge:

1. **Oliveira AP**, Valentão P, Pereira JA, Silva BM, Tavares F, Andrade PB. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. Food Chem Toxicol 2009 Nov; 47(11): 2841-46.
2. **Oliveira AP**, Silva LR, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. Determination of low molecular weight volatiles in *Ficus carica* using HS-SPME and GC/FID. Food Chem 2010 Aug, 121(4): 1289-95.
3. **Oliveira AP**, Silva LR, Ferreres F, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* latex. J Agric Food Chem 2010 Mar, 58(6): 3393-98.
4. **Oliveira AP**, Silva LR, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC-IT-MS. Food Chem 2010 Nov, 123(2): 548-57.
5. **Oliveira AP**, Silva LR, Andrade PB, Valentão P, Silva BM, Gonçalves RF, Pereira JA, Guedes de Pinho P. Further insights into *Ficus carica* latex metabolite profile. J Agric Food Chem 2010 Oct, 58(20): 10855-63.
6. **Oliveira AP**, Baptista P, Valentão P, Silva BM, Martins F, Pereira JA, Silva, BM, Andrade PB. Characterization of *Ficus carica* L. cultivars by DNA and secondary metabolites analysis: Is genetic diversity reflected in the chemical composition? Food Res Int (aceite para publicação).

Comunicações em congressos ou cursos, que foram submetidas a revisão pelas suas Comissões Científicas e ficaram registadas nos respetivos livros de atas:

Comunicações orais

1. **Oliveira AP**, Silva LR, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira, JA, Andrade PB. Autenticidade de cultivares portuguesas de *Ficus carica*. Comunicação efetuada pela própria no Curso de Autenticidade de Produtos Alimentares, na sequência de convite. 12 e 13 de Março de 2010. Bragança (Portugal).
2. **Oliveira AP**, Valentão P, Silva BM, Andrade, PB. *Ficus carica* L.: das análises químicas aos ensaios biológicos. Comunicação efetuada pela própria no Seminário de Análises Clínicas e Saúde Pública “Águas, Alimentos e Ambiente”, na sequência de convite. 13 de Abril de 2011. Porto (Portugal).

Comunicações sob a forma de painel

1. **Oliveira AP**, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. *Ficus carica*: metabolic and antioxidant screening. **42nd IUPAC Congress: Chemistry Solutions**. 2 a 7 de Agosto de 2009. Glasgow (Reino Unido).
2. Silva LR, **Oliveira AP**, Sousa C, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Teixeira JP, Costa S, Coelho P, Andrade PB. Protective effect of *Ficus carica* leaf extract on SH-SY5Y and V-79 cells. **ECNIS International Workshop on Biomarkers and Cancer**. 21 a 23 de Setembro de 2009. Porto (Portugal).
3. **Oliveira AP**, Silva LR, Taveira M, Pereira DM, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. Determination of volatile compounds in Portuguese *F. carica*. **6º Encontro Nacional de Cromatografia**. 14 a 16 de Dezembro de 2009. Funchal (Portugal).
4. **Oliveira AP**, Silva LR, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. *Ficus carica* latex: chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity. **3rd meeting of young researchers at UP- IJUP 2010**. 17 a 19 de Fevereiro de 2010. Porto (Portugal).

5. **Oliveira AP**, Silva LR, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic and biological activities of *Ficus carica* materials. **1ª Workshop Anual BioPlant**. 29 e 30 Março de 2010. Porto (Portugal).
6. **Oliveira AP**, Silva LR, Guedes de Pinho P, Valentão P, Silva BM, Pereira JA, Andrade PB. Further insights into *Ficus carica* latex metabolome. **58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research**. 29 de Agosto de 2010 a 2 de Setembro de 2010. Berlim (Alemanha).
7. Silva BM, **Oliveira AP**, Silva LR, Guedes de Pinho P, Valentão P, Pereira JA, Andrade PB. Low molecular weight volatiles in Portuguese *Ficus carica* cultivars. **58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research**. 29 de Agosto de 2010 a 2 de Setembro de 2010. Berlim (Alemanha).
8. **Oliveira AP**, Sousa C, Moita E, Valentão P, Silva BM, Andrade PB, Gonçalves RF. Viability assays to evaluate *F. carica* leaf effects on V79 cells. **2ª Workshop Anual BioPlant**. 18 e 19 Abril de 2011. Braga (Portugal).

A autora declara que participou ativamente na recolha e estudo do material incluído em todos os trabalhos, tendo redigido os textos com a ativa colaboração dos outros autores.

AGRADECIMENTOS

Ao tornar pública esta dissertação, sinto o dever e a necessidade de expressar o meu profundo agradecimento a todos os que contribuíram para a concretização deste trabalho e que, de alguma forma, me ajudaram a ultrapassar as dificuldades sentidas durante este período da minha formação e da minha vida. Assim, não posso deixar de agradecer, sensibilizada e reconhecidamente:

À Professora Doutora Paula Cristina Branquinho de Andrade expresso o meu sincero e reconhecido agradecimento, pela orientação desta dissertação. Antes de tudo, agradeço a oportunidade de integração no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por todo o apoio científico, pela sua pronta disponibilidade perante todas as situações e pela confiança em mim depositada. Pelo seu empenho, competência, dinamismo e espírito crítico que tanto a caracterizam, pelos valiosos ensinamentos prestados, os quais foram essenciais para o meu crescimento científico e pela sua enorme capacidade de trabalho. A sua profunda experiência e o seu constante estímulo pelo estudo na área da Farmacognosia muito contribuíram para o enriquecimento deste trabalho. Agradeço também por, muito além de ser minha orientadora, se ter revelado uma amiga e por todos os excelentes momentos que passamos nesta qualidade. É a si que devo este doutoramento. O meu profundo agradecimento. Muito obrigada.

À Professora Doutora Patrícia Carla Ribeiro Valentão, co-orientadora desta dissertação, expresso a minha admiração pela sua constante disponibilidade, pelos valiosos conhecimentos científicos transmitidos, pela sua grande dedicação ao Laboratório de Farmacognosia e pela sua imensa capacidade de trabalho. Agradeço a confiança em mim depositada, todo o incentivo bem como toda a paciência que teve comigo ao longo destes anos, tentando que eu fizesse sempre “mais e melhor”. Agradeço também, a amizade por mim demonstrada e todos os bons momentos passados. O meu profundo agradecimento. Muito obrigada.

À Professora Doutora Branca Maria Cardoso Monteiro Silva, co-orientadora desta dissertação, expresso o meu agradecimento por ter sido fundamental em determinada altura do meu percurso académico, pela amizade e pelos melhores conselhos que me transmitiu. O meu profundo reconhecimento por acreditar em mim e me ter feito chegar ao sítio certo. Muito obrigada.

Ao Professor Doutor José Alberto Pereira, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, por ter facultado a identificação e assegurado o fornecimento do material vegetal.

Ao Professor Doutor Federico Ferreres, do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), pela disponibilidade e pelo contributo na tentativa de identificação dos compostos fenólicos por HPLC-DAD-MS.

Ao Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, nomeadamente ao Professor Doutor Fernando Remião, por ter sempre disponibilizado todos os recursos materiais de que necessitei para a experimentação celular e à Professora Doutora Helena Carmo, por ter facultado as células com que realizei os ensaios celulares desta dissertação.

Aos vários elementos do Departamento de Saúde Ambiental do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), nomeadamente ao Doutor João Paulo Teixeira, por me ter recebido no seu departamento e pelo auxílio prestado no desenvolvimento dos ensaios de genotoxicidade.

À Doutora Carla Sousa, pelo auxílio prestado na elaboração dos ensaios celulares desta dissertação, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade várias vezes demonstrada.

À Doutora Paula Guedes de Pinho, pela colaboração em trabalhos que enriqueceram esta dissertação e pelos conhecimentos transmitidos de GC-MS.

Ao Doutor Luís Silva, por todo o seu apoio e colaboração em trabalhos desta dissertação.

À Professora Doutora Paula Baptista, pelos conhecimentos que me transmitiu nos estudos de diversidade genética que realizei durante a minha estadia no Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança.

À Fátima Martins, Ivo Oliveira e Ricardo Malheiro, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, pelo acompanhamento e pelo apoio prestado no estudo da diversidade genética.

Ao Marcos Taveira, à Fátima Fernandes, à Graciliana Lopes e à Brigida Pinho, meus colegas de doutoramento e acima de tudo meus amigos, pelo companheirismo, pelos bons momentos que passámos e pelo apoio constante. Aos dois primeiros, quero exprimir um especial agradecimento por estarem sempre presentes, pelas palavras de encorajamento e pelas inúmeras provas de amizade, a qual sei que será para sempre.

A todos aqueles que conviveram comigo no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, pela boa disposição, simpatia, alegria e pela amizade que se foi estabelecendo.

Ao Didier, um agradecimento muito especial, por todo o seu apoio, carinho, pelas palavras de encorajamento, pela partilha de bons e maus momentos e por ter tolerado as minhas inúmeras faltas de paciência.

Aos meus irmãos, Rafael, João e André, e à Sandra Oliveira, agradeço os gestos de afeto, as constantes palavras de incentivo, os bons momentos passados e sobretudo o gosto que sempre me transmitiram em ter-me como membro da vossa família.

Ao Manuel Moreira um agradecimento especial, pela confiança em mim depositada e pelo constante apoio.

Aos meus pais, a quem muito devo e a quem dedico esta tese de doutoramento. Desejo exprimir a minha profunda gratidão pelas portas que me abriram, pela confiança que em mim depositaram, por todos os sacrifícios que por mim realizaram, pelo carinho, incentivo e apoio constantes. À minha mãe exprimo um especial agradecimento pela inesgotável paciência que tem para comigo e sobretudo por estar sempre presente em todos os momentos.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia, pelo suporte financeiro através da atribuição da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/47620/2008) no âmbito POPH – QREN – Tipologia 4.1 – Formação Avançada, comparticipada pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do MCTES.

RESUMO

RESUMO

Ficus carica L., vulgarmente denominada figueira-comum, é a única espécie do género *Ficus* que origina frutos comestíveis, os quais possuem elevado valor nutricional. Em Portugal continental, a região de Trás-os-Montes (nordeste de Portugal) é reconhecida como uma das principais produtoras de diversas cultivares de *F. carica*. Contudo, apesar do seu elevado consumo, estas cultivares constituem uma matriz pouco explorada. Assim, nesta dissertação pretendeu-se contribuir para a caracterização fitoquímica, biológica e molecular de diversos materiais (folhas, cascas, polpas e látex) de cinco cultivares Portuguesas de *F. carica*: “Pingo de Mel”, “Branca Tradicional”, “Verbera Preta”, “Borrasota Tradicional” e “Preta Tradicional”.

O perfil metabólico foi caracterizado relativamente a metabolitos primários (ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos gordos) e secundários (compostos fenólicos, fitosteróis e compostos voláteis).

O perfil de ácidos orgânicos das folhas, cascas e polpas das cultivares “Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”, bem como do látex da cultivar “Pingo de Mel” foi determinado por HPLC-UV. Verificou-se que os diversos materiais de *F. carica* constituem uma boa fonte destes metabolitos, sendo as folhas as mais ricas. O ácido málico é o principal componente de todos os materiais. Outros compostos comuns a todas as matrizes, embora minoritários, são os ácidos xiquímico e fumárico. O ácido quínico foi detetado exclusivamente nas folhas e no látex, possibilitando a distinção destes materiais.

Os ácidos gordos livres e os aminoácidos presentes no látex da cultivar “Pingo de Mel” foram determinados em extratos hidrolisados, e após derivatização, por GC-MS e por HPLC-UV/Vis, respetivamente, tendo sido identificados 14 ácidos gordos e 13 aminoácidos. Relativamente aos primeiros, verificou-se que os ácidos araquídico e palmítico são os compostos mais abundantes. No que concerne aos aminoácidos, observou-se que esta matriz é constituída essencialmente por aminoácidos não essenciais, sendo a cisteína e tirosina os metabolitos dominantes.

O perfil de compostos fenólicos dos extratos aquosos de folhas, cascas e polpas de duas cultivares (“Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”) foi determinado por HPLC-DAD, tendo sido identificados três derivados de ácidos hidroxicinâmicos (ácidos 3- e 5-O-cafeoilquínico e ferúlico), dois heterósidos de quercetina (quercetina-3-O-glucósido e quercetina-3-O-rutinósido) e duas furanocumarinas (psoraleno e bergapteno). De modo geral, os diferentes materiais apresentaram um perfil semelhante, verificando-se uma predominância de flavonoides sobre os ácidos fenólicos e furanocumarinas. As polpas distinguem-se das folhas e cascas pela ausência de ácido ferúlico. Adicionalmente, com

o intuito de determinar a composição fenólica do látex de *F. carica*, procedeu-se à sua análise por HPLC-DAD-MS; contudo, não foi possível identificar qualquer composto.

Foi também estudado o perfil de fitosteróis do látex da cultivar “Pingo de Mel”, bem como das folhas das cinco cultivares Portuguesas de *F. carica*, após hidrólise alcalina, por HPLC-DAD, tendo sido identificados 7 compostos livres. O látex revelou ser a matriz mais rica nestes metabolitos, destacando-se o β -sitosterol como maioritário. As folhas apresentaram um perfil qualitativo semelhante e caracterizam-se pela presença de grandes quantidades de lanosterol.

Os compostos voláteis de baixo peso molecular existentes nas folhas, cascas e polpas das cultivares “Pingo de Mel” e “Branca Tradicional” foram caracterizados por HS-SPME/GC-FID, tendo sido detetadas quantidades apreciáveis de metanol, etanol e de acetaldeído nas diferentes matrizes. A influência dos métodos de processamento (congelamento e liofilização) foi também avaliada e, de modo geral, observou-se uma diminuição da maioria dos compostos nas amostras liofilizadas.

Foram também identificados, por HS-SPME/GC-MS, 68 metabolitos de diversas classes na fração volátil e semi-volátil das folhas e frutos das cinco cultivares de *F. carica*, bem como do látex da cultivar “Pingo de Mel”. As diferentes cultivares revelaram um perfil semelhante e, de modo geral, para todas as classes de metabolitos foram encontrados compostos específicos de determinado material, os quais poderão ter interesse para a sua distinção. Em termos quantitativos, os frutos distinguem-se dos outros materiais vegetais pela maior abundância e diversidade de aldeídos e monoterpenos.

A diversidade genética das cinco cultivares de *F. carica* foi analisada recorrendo à determinação de caracteres morfológicos e moleculares. Apesar de se terem verificado diferenças morfológicas, estas não permitiram o agrupamento nítido dos diferentes indivíduos da mesma cultivar. No que concerne aos marcadores moleculares, foram amplificadas duas regiões do cpDNA (*rbcL* e *trnH-psbA*), verificando-se um melhor agrupamento das cultivares com a região *rbcL*. Na generalidade, não foi observada qualquer correlação entre a variabilidade genética e a composição em metabolitos secundários.

Relativamente à avaliação do potencial biológico destas matrizes, foi estudada a sua capacidade antioxidante face a diversas espécies reativas em sistemas químicos, nomeadamente contra os radicais DPPH, anião superóxido e óxido nítrico. Embora as folhas tenham demonstrado maior potencial antioxidante do que o látex, estes foram os únicos materiais que revelaram capacidade para intercetar todas as espécies em estudo, sendo esta atividade mais evidente contra o radical anião superóxido. De um modo geral,

para os diversos materiais vegetais verificou-se que a atividade é dependente da concentração.

Tendo em conta o potencial antioxidante dos diversos materiais, procedeu-se à avaliação dos efeitos citotóxicos ou protetores dos extratos em fibroblastos de pulmão de hamster (células V79) e células de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y) sujeitas a stress oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogénio e rotenona, respetivamente. Porém, os resultados observados nos sistemas químicos não foram confirmados nos ensaios celulares. Os extratos por si só não se revelaram citotóxicos. No entanto, não protegeram as células do dano induzido pelos agentes agressores, tendo agravado os efeitos deletérios causados por estes nas concentrações mais elevadas.

Atendendo, ainda, a que os extratos aquosos de folhas tinham demonstrado anteriormente uma atividade antioxidante promissora, foram realizados estudos preliminares para avaliar a genotoxicidade desta matriz através do ensaio do cometa. Os resultados preliminares obtidos sugerem um efeito protetor do extrato contra os efeitos nocivos induzidos pela rotenona.

A capacidade para inibir a enzima acetilcolinesterase dos extratos aquosos das folhas, cascas e polpas das cultivares “Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”, bem como do látex da primeira cultivar, foi também avaliada. De entre os diversos materiais vegetais, o látex foi o único que revelou algum efeito.

O trabalho realizado incrementou o conhecimento de cinco cultivares Portuguesas de *F. carica* de grande consumo. Os compostos descritos e o potencial biológico revelado sugerem que os materiais em estudo poderão dar um contributo benéfico para a saúde.

ABSTRACT

Abstract

Ficus carica L., usually known as the common fig tree, is the only species of the *Ficus* genus with edible fruits, having high nutritional value. In Portugal, Trás-os-Montes region (northeast of Portugal) is recognized as one of the main producing regions of several *F. carica* cultivars. Nevertheless, despite their high consumption, these cultivars are poorly studied. Thus, with this thesis we intended to contribute to the phytochemical, biological and molecular characterization of several materials (leaves, peels, pulps and latex) from five *F. carica* Portuguese cultivars: “Pingo de Mel”, “Branca Tradicional”, “Borrasota Tradicional”, “Preta Tradicional” and “Verbera Preta”.

The metabolic profile was characterized with respect to primary (organic acids, amino acids and fatty acids) and secondary metabolites (phenolics, phytosterols and volatile compounds).

Organic acids profile of leaves, peels and pulps from “Pingo de Mel” and “Branca Tradicional” cultivars, as well as of latex from “Pingo de Mel”, was determined by HPLC-UV. The analyzed materials revealed to be good sources of this kind of metabolites, leaves being the richest one. Malic acid was the main compound in all materials. Xiquimic and fumaric acids, although present in lower amounts, were common to all analysed samples. Quinic acid was only detected in leaves and latex, allowing the distinction of these materials.

Free fatty acids and free amino acids profiles of latex from “Pingo de Mel” cultivar were determined in hydrolyzed extracts, after derivatization, by GC-MS and HPLC-UV/Vis, respectively, 14 fatty acids and 13 amino acids being identified. Concerning fatty acids, arachidic and palmitic acids are the main compounds. Regarding the amino acids profile, this material is essentially constituted by non-essential amino acids, cysteine and tyrosine being dominant.

The phenolic profile of the aqueous extracts of leaves, peels and pulps from “Pingo de Mel” and “Branca Tradicional” cultivars was characterized by HPLC-DAD, being identified three hydroxycinnamic acids (3- and 5-O-caffeoylquinic acids and ferulic acid), two quercetin heterosides (quercetin-3-O-glucoside and quercetin-3-O-rutinoside) and two furanocoumarins (psoralen and bergapten). In a general way, the different materials presented a similar profile, flavonoids contents being significantly higher than those of phenolic acids and furanocoumarins. Pupls can be distinguished from leaves and peels by the absence of ferulic acid. Additionally, in order to determine the phenolic profile of *F. carica* latex, we proceeded to its analysis by HPLC-DAD-MS; however, no phenolic compound could be identified.

Phytosterols profiles of latex from “Pingo de Mel” cultivar and leaves from the five *F. carica* Portuguese cultivars were also studied, after alkaline hydrolysis, by HPLC-DAD, seven free compounds being identified. *F. carica* latex has a higher content of phytosterols compared to the leaves, β -sitosterol being the major compound. Leaves exhibit a similar qualitative profile, though showing lanosterol as the main phytosterol.

Low molecular weight volatiles composition of the leaves, peels and pulps from “Pingo de Mel” and “Branca Tradicional” cultivars was characterized by HS-SPME/GC-FID, appreciable amounts of methanol, ethanol and acetaldehyde being detected in all matrices. The influence of the processing methods (freezing and lyophilization) was also evaluated and, in a general way, a decrease of the majority of compounds in lyophilized samples was observed.

Sixty-eight metabolites of various classes were identified, by HS-SPME/GC-MS, in the volatile and semi-volatile fractions of the leaves and fruits of *F. carica* cultivars, as well as in the latex of “Pingo de Mel” one. The five cultivars showed a similar profile; nevertheless within each class of compounds some specific metabolites can be used for the distinction of the several materials. In quantitative terms, the fruits are distinguished from other vegetal materials by the high abundance and diversity of aldehydes and monoterpenes.

The genetic diversity of the five *F. carica* cultivars was assessed by the evaluation of their morphological traits and molecular markers. Morphological differences were detected, although, they didn't allow a clear grouping of different individuals from the same cultivar. Regarding the molecular markers, two chloroplastic DNA regions (*rbcl* and *trnH-psbA*) were amplified, *rbcl* being the one allowing a better clustering of the cultivars. In a general way, no correlation was observed between genetic variability and secondary metabolites composition.

Concerning the biological potential of these matrices, their antioxidant capacity was evaluated in chemical systems against several reactive species, namely DPPH, superoxide anion and nitric oxide radicals. In a general way, all extracts showed a concentration-dependent activity. *F. carica* leaves and latex were the only matrices revealing ability to scavenge all reactive species, more evident against superoxide radical, although the leaves demonstrated greater antioxidant potential.

Attending to the antioxidant potential displayed by the several materials, we proceeded to the evaluation of the protective or cytotoxic effects of extracts in hamster lung fibroblasts (V79 cells) and human neuroblastoma cells (SH-SY5Y cells) subjected to hydrogen peroxide and rotenone-induced oxidative stress, respectively. However, the results obtained in the cell-free systems were not confirmed in the cellular model.

The extracts did not reveal any cytotoxic effect. However, the extracts did not protect the cells from the oxidative damage induced by the aggressive agents, being aggravated the deleterious effects caused by these for the highest concentrations. The genotoxicity of the leaves aqueous lyophilized extract was also assessed by comet assay. The preliminary results suggest a protective effect of the extract against the deleterious effects induced by rotenone.

The acetylcholinesterase inhibitory capacity of the aqueous extracts of leaves, peels and pulps of "Pingo de Mel" and "Branca Tradicional" cultivars, as well as of the latex from the first cultivar, was also measured. Among the several vegetal materials, latex was the only one exhibiting some effect.

This study extended the knowledge on five *F. carica* Portuguese cultivars widely used for human consumption. The determined metabolites and the biological potential displayed by the analyzed materials point to their beneficial contribution for human health.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL

PUBLICAÇÕES.....	VII
AGRADECIMENTOS	XI
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XXIII
ÍNDICE GERAL.....	XXIX
ÍNDICE DE FIGURAS	XXXV
ÍNDICE DE TABELAS	XLIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XLVII

ESTRUTURA GERAL DA TESE	1
--------------------------------------	----------

PARTE I

2. INTRODUÇÃO	5
2.1. Introdução geral	5
2.1.1. <i>Ficus carica</i> L.....	5
2.1.2. Valor nutricional do fruto	7
2.1.3. Importância económica do fruto em Portugal	9
2.2. Caracterização do metaboloma.....	9
2.2.1. Metabolismo primário.....	11
2.2.1.1. Ácidos orgânicos	11
2.2.1.1.1. Extração e purificação	13
2.2.1.1.2. Separação e identificação por HPLC	13
2.2.1.1.3. Ácidos orgânicos em <i>F. carica</i>	14
2.2.1.2. Aminoácidos	14
2.2.1.2.1. Biossíntese.....	16
2.2.1.2.2. Separação e identificação por HPLC	18
2.2.1.2.3. Aminoácidos em <i>F. carica</i>	19
2.2.1.3. Ácidos gordos.....	19
2.2.1.3.1. Biossíntese.....	22
2.2.1.3.2. Extração, purificação e separação por GC-MS.....	23
2.2.1.3.3. Ácidos gordos em <i>F. carica</i>	24

2.2.2. Metabolismo secundário.....	24
2.2.2.1. Compostos fenólicos	24
2.2.2.1.1. Ácidos hidroxicinâmicos	25
2.2.2.1.1.1. Biossíntese	26
2.2.2.1.2. Flavonoides.....	28
2.2.2.1.2.1. Biossíntese	31
2.2.2.1.3. Cumarinas.....	32
2.2.2.1.3.1. Cumarinas simples	32
2.2.2.1.3.1.1. Biossíntese	33
2.2.2.1.3.2. Furanocumarinas	34
2.2.2.1.3.2.1. Biossíntese	34
2.2.2.1.4. Extração e purificação.....	36
2.2.2.1.5. Separação por HPLC	36
2.2.2.1.6. Detecção de compostos fenólicos.....	37
2.2.2.1.6.1. Espectros de UV de ácidos hidroxicinâmicos.....	38
2.2.2.1.6.2. Espectros de UV de flavonoides	38
2.2.2.1.6.3. Espectros de UV de cumarinas.....	39
2.2.2.1.7. Espectrometria de massa	40
2.2.2.1.8. Métodos auxiliares	41
2.2.2.1.9. Compostos fenólicos em <i>F. carica</i>	41
2.2.2.2. Fitosteróis.....	42
2.2.2.2.1. Biossíntese	43
2.2.2.2.2. Extração, purificação e separação por HPLC	44
2.2.2.2.3. Fitosteróis em <i>F. carica</i>	46
2.2.2.3. Compostos voláteis	46
2.2.2.3.1. Derivados de terpenóides	47
2.2.2.3.2. Derivados de ácidos gordos (via lipoxigenase).....	49
2.2.2.3.3. Norisoprenóides	50
2.2.2.3.4. Extração.....	51
2.2.2.3.5. GC-MS	52
2.2.2.3.6. Compostos voláteis em <i>F. carica</i>	53
2.3. Caracterização morfológica e molecular.....	55
3. Atividades biológicas	58
3.1. Atividade antioxidante	58
3.1.1. Compostos antioxidantes	60
3.1.1.1. Ácidos orgânicos	60
3.1.1.2. Aminoácidos.....	61

3.1.1.3. Compostos fenólicos	62
3.1.1.3.1. Ácidos fenólicos	63
3.1.1.3.2. Flavonoides	63
3.1.1.3.3. Cumarinas	64
3.1.1.4. Fitosteróis	65
3.1.1.5. Ácidos gordos	65
3.1.1.6. Compostos voláteis	66
3.2. Inibição da acetilcolinesterase	66
3.3. Ensaios em sistemas celulares	67
 4. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO	 69
 PARTE II	
 5. SECÇÃO EXPERIMENTAL	 71
5.1. <i>Ficus carica</i> L.: Metabolic and biological screening	73
5.2. Determination of low molecular weight volatiles in <i>Ficus carica</i> using HS-SPME and GC/FID	81
5.3. Volatile profiling of <i>Ficus carica</i> varieties by HS-SPME and GC-IT-MS	91
5.4. Chemical assessment and <i>in vitro</i> antioxidant capacity of <i>Ficus carica</i> latex	103
5.5. Further insight into the latex metabolite profile of <i>Ficus carica</i>	111
5.6. Characterization of <i>Ficus carica</i> L. cultivars by DNA and secondary metabolite analysis: Is genetic diversity reflected in the chemical composition?	123
5.7. Análise do perfil fenólico do látex por HPLC-DAD-MS	163
5.7.1. Condições analíticas	163
5.8. Avaliação de efeitos celulares	164
5.8.1. Substâncias de referência e reagentes	164
5.8.2. Preparação dos extratos	164
5.8.3. Análise por HPLC-DAD	165
5.8.4. Cultura celular	165
5.8.4.1. Determinação da viabilidade celular	166
5.8.4.1.1. Ensaio do MTT	166
5.8.4.1.2. Determinação da LDH	166
5.8.4.2. Genotoxicidade	167
5.8.4.2.1. Ensaio do cometa	167

PARTE III

6.DISSCUSSÃO INTEGRADA.....	171
6.1. Perfil metabólico de <i>F. carica</i>.....	171
6.1.1. Ácidos orgânicos	171
6.1.2. Ácidos gordos.....	177
6.1.3. Aminoácidos.....	178
6.1.4. Compostos fenólicos	179
6.1.4.1. Folha e fruto	180
6.1.4.1.1. Extratos aquosos	180
6.1.4.1.2. Extratos de solventes orgânicos.....	185
6.1.4.2. Látex	191
6.1.5. Fitosteróis.....	193
6.1.6. Compostos voláteis	196
6.1.6.1. Compostos voláteis de baixo peso molecular.....	196
6.1.6.2. Caracterização da fração volátil por GC-MS	198
6.2. Caracterização morfológica e molecular.....	204
6.3. Atividade biológica de <i>F. carica</i>.....	207
6.3.1. Ação antioxidante	207
6.3.1.1. Sistemas químicos	207
6.3.1.1.1. DPPH'	207
6.3.1.1.2. Radical anião superóxido	208
6.3.1.1.3. Óxido nítrico	209
6.3.1.2. Sistemas celulares	210
6.3.1.2.1. Células V79.....	211
6.3.1.2.2. Células SH-SY5Y	214
6.3.2. Inibição da acetilcolinesterase	218
6.3.3. Atividade antimicrobiana.....	218
7. CONCLUSÕES.....	221

PARTE IV

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	225
--	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ficus carica</i> L. (Fotografias de Andreia P. Oliveira)	6
Figura 2. Produção de árvores de fruto em Portugal continental nos anos de 2007 a 2010.....	9
Figura 3. Esquema simplificado da interação entre metabolitos primários e secundários [adaptado de (16)]	10
Figura 4. Conversão dos aminoácidos a ureia [adaptado de (42)]	18
Figura 5. Esquema simplificado da biossíntese dos ácidos gordos e metabolismo dos lípidos nas plantas. ACCase, acetil-CoA carboxilase; ACP, proteína transportadora de acilo; FAS, ácido gordo sintase [adaptado de (47)]	23
Figura 6. Estrutura dos principais ácidos hidroxicinâmicos	26
Figura 7. Representação esquemática da biossíntese de compostos fenólicos [adaptada de (85)]	28
Figura 8. Estrutura química geral dos flavonoides	29
Figura 9. Representação esquemática da biossíntese de flavonoides. CHS, chalcona sintase e CHI, chalcona isomerase [adaptada de (64)]	31
Figura 10. Esquema simplificado da biossíntese de cumarinas simples. CA2H, cinamato 2-hidroxilase; CA4H, cinamato 4-hidroxilase; CO2H, ácido cinâmico 2-hidroxilase; HCT, hidroxicinamoil transferase; 4CL, 4-cumarato: coenzima A liase; CoA, coenzima A [adaptado de (94)]	33
Figura 11. Representação esquemática da biossíntese das furanocumarinas [adaptada de (94)]	35
Figura 12. Estrutura química da quercetina	39
Figura 13. Estrutura química dos principais fitosteróis das plantas	43

Figura 14. Esquema simplificado da biossíntese de esteróis nas plantas. CAS, cicloartenol sintase; LAS, lanosterol sintase [adaptado de (133)]	44
Figura 15. Locais de quebra de fitosteróis conjugados, por hidrólise alcalina e hidrólise ácida: (A) conjugação com ácido gordo; (B) conjugação com ácido hidroxicinâmico; (C) conjugação com açúcar; (D) conjugação com açúcar e ácido gordo [adaptada de (134)]	45
Figura 16. Esquema geral da biossíntese de terpenos. Abreviaturas: IPP, pirofosfato de isopentenilo; DMAPP, pirofosfato de dimetilalilo; FPP, pirofosfato de farnesilo; GPP, pirofosfato de geranilo; GGPP, pirofosfato de geranilgeranilo [adaptado de (146)]	48
Figura 17. Biossíntese de compostos voláteis <i>via</i> lipoxigenase. AAT, álcool aciltransferase; ADH, álcool desidrogenase; AER, aleno óxido redutase; AOC, aleno óxido ciclase; AOS, aleno óxido sintase; LOX, lipoxigenase; HPL, hidroperoxidase liase; (3Z,2E)-EI, (3Z,2E)-enal isomerase [adaptada de (85)]	49
Figura 18. Produtos da quebra oxidativa do β -caroteno [adaptado de (153)]	51
Figura 19. Representação esquemática de uma célula vegetal e localização do DNA nos cloroplastos	56
Figura 20. Dano oxidativo induzido por espécies reativas de oxigénio e de azoto: $\cdot\text{NO}$, radical óxido nítrico; $\cdot\text{OH}$, radical hidroxilo; $\text{O}_2\cdot^-$, radical anião superóxido, $\text{RO}\cdot$, radical alcóxido; $\text{ROO}\cdot$, radical peróxido; ONOO^- , anião peroxinitrito; H_2O_2 , peróxido de hidrogénio; HOCl , ácido hipocloroso [adaptado de (188)]	59
Figura 21. Representação esquemática da ação integrada de vários mecanismos (enzimáticos e não enzimáticos) envolvidos na proteção contra o stress oxidativo. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPX, glutathione peroxidase; GR, glutathione redutase; GSH, glutathione reduzida; GSSG, glutathione oxidada [adaptada de (194)]	60
Figura 22. Relação estrutura – atividade antioxidante de ácidos hidroxicinâmicos [adaptada de (66)]	63

Figura 23. Relação estrutura – atividade antioxidante de flavonoides [adaptada de (215)].....	64
Figura 24. Ácidos orgânicos na folha e fruto (cascas e polpas) de duas cultivares brancas de <i>F. carica</i> (“Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”)	173
Figura 25. Ácidos orgânicos no látex da cultivar “Pingo de Mel”	173
Figura 26. Diagrama de componentes principais do conteúdo de ácidos orgânicos em folhas e frutos (casca e polpa) de <i>F. carica</i> (mg/Kg). As componentes principais 1 e 2 representam 93,4% da variância total. PM, cultivar “Pingo de Mel”; BT, cultivar “Branca Tradicional”	175
Figura 27. Diagrama de componentes principais aplicado ao conteúdo em ácidos orgânicos das folhas, frutos (casca e polpa) e látex da cultivar “Pingo de Mel” (mg/Kg). As componentes principais 1 e 2 representam 95,9% da variância total	176
Figura 28. Composição em ácidos gordos do látex da cultivar “Pingo de Mel”. C14:0, Ácido mirístico; C15:0, ácido pentadecanóico; C16:0, ácido palmítico; C17:0, ácido heptadecanóico; C18:0, ácido esteárico; C18:1c, ácido oleico; C18:1t, ácido elaídico; C18:2, ácido linoleico; C20:0, ácido araquídico; C21:0, ácido heneicosanóico, C22:0, ácido beénico; C23:0, ácido tricosanóico; C24:0, ácido lignocérico.....	177
Figura 29. Perfil de aminoácidos essenciais (A) e não essenciais (B) do látex de <i>F. carica</i>	179
Figura 30. Derivados de ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides e furanocumarinas nas folhas e frutos (casca e polpa) de duas cultivares brancas de <i>F. carica</i>	183
Figura 31. Biossíntese dos ácidos clorogénicos. HCT, hidroxicinamoiltransferase; C3H, <i>p</i> -cumarato 3-hidroxilase e CoASH, coenzima A [adaptada de (262)]	184
Figura 32. Diagrama de componentes principais do conteúdo de compostos fenólicos das amostras analisadas (mg/Kg). As componentes principais 1 e 2 representam 92,2% da variância total. 3-CQA, Ácido 3-O-cafeoilquínico; 5-CQA, ácido 5-O-cafeoilquínico; Q-3-Glu, quercetina-3-O-glucósido; Q-3-Rut, quercetina-3-O-rutinósido; PM, cultivar “Pingo de Mel”; BT, cultivar “Branca Tradicional”	185

- Figura 33.** Composição fenólica dos extratos metanólicos das folhas de diferentes cultivares de *F. carica*: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 indivíduos analisados em triplicado 187
- Figura 34.** Perfil cromatográfico dos extratos metanólico (A) e de acetato de etilo (B) de folhas de *F. carica*, obtido por HPLC-DAD. Detecção a 320 nm. (1) Ácido 5-O-cafeoilquínico; (2) ácido ferúlico; (3) quercetina-3-O-rutinósido; (4) psoraleno; (5) quercetina; (6) bergapteno 188
- Figura 35.** Perfil cromatográfico do látex obtido por HPLC-DAD-MS. (A) Cromatograma UV a 330 nm; (B) Cromatograma registado a 280 nm; (C) TIC no modo negativo; (D) TIC no modo positivo..... 192
- Figura 36.** Fitosteróis no látex de *F. carica*, cultivar “Pingo de Mel” 193
- Figura 37.** Fitosteróis nos extratos hidrolisados das folhas de diferentes cultivares de *F. carica*: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 indivíduos analisados em triplicado..... 195
- Figura 38.** Compostos voláteis de baixo peso molecular em folhas e frutos (casca e polpa) de duas cultivares de *F. carica* sujeitas a dois tipos de conservação. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 determinações..... 197
- Figura 39.** Classes químicas dos compostos voláteis do látex de *F. carica*, cultivar “Pingo de Mel” 201
- Figura 40.** Compostos voláteis nas folhas e frutos (casca e polpa) de 5 cultivares de *F. carica*: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”, Borr, “Borrasota Tradicional”, VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 determinações. 202
- Figura 41.** Esquema simplificado da relação biossintética existente entre diferentes classes de compostos. F6P, frutose-6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; DOXP, 1-desoxi-D-xilulose fosfato; DOXR, redutoisomerase de 1-desoxi-D-xilulose fosfato; GA-3P,

gliceraldeído-3-fosfato; LOX, lipoxigenase; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; HPL, hidroperóxido liase; AOS, aleno óxido sintase; JMT, metiltransferase do ácido jasmónico [adaptado de (139)] 203

Figura 42. Folhas das cinco cultivares de *F. carica* (Fotografias de Andreia P. Oliveira)..... 204

Figura 43. Dendrograma obtido da análise de *clusters* relativa às caraterísticas morfológicas de 3 indivíduos de folhas de 5 cultivares de *F. carica*. PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os números associados a cada cultivar correspondem a diferentes indivíduos..... 205

Figura 44. Efeito do extrato aquoso liofilizado de folhas de *F. carica* da cultivar “Pingo de Mel” na viabilidade de células V79, após 24 horas de tratamento, com e sem indução de stress oxidativo pelo H₂O₂. Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; **p*<0,05 e ***p*<0,001 relativamente ao ensaio sem extrato..... 212

Figura 45. Efeito dos extratos metanólico e acetato de etilo de folhas e frutos (casca e polpa) da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* na viabilidade de células V79. Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; **p*<0,05 e ***p*<0,001 relativamente ao ensaio ensaio sem extrato..... 213

Figura 46. Efeito do bergapteno e psoraleno na viabilidade de células V79. Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado 214

Figura 47. Efeito do extrato aquoso liofilizado de folhas da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* na viabilidade de células SH-SY5Y, avaliado através da redução do MTT e da libertação de LDH para o meio extracelular (LDHe). Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado 214

Figura 48. Efeito da rotenona na viabilidade de células SH-SY5Y, avaliado através da redução do MTT e da libertação de LDH para o meio extracelular (LDHe). Os valores obtidos representam a média ± desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; **p*<0,01 e ***p*<0,001 relativamente ao ensaio sem rotenona 215

Figura 49. Efeito do extrato aquoso liofilizado de folhas da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* + rotenona na viabilidade de células SH-SY5Y, avaliado através da redução do MTT e da libertação de LDH para o meio extracelular (LDHe). Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p<0,01$ e ** $p<0,001$ relativamente ao controlo216

Figura 50. Ensaio do cometa em células SH-SY5Y. A) Células não tratadas; B) células tratadas com extrato de folhas da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* (1,5 mg/mL); C) células expostas à rotenona (250nM); D) células tratadas com extrato de folhas de *F. carica* (1,5 mg/mL) e expostas à rotenona (250nM)217

Figura 51. Efeito do extrato aquoso de folhas (1,5 mg/mL) de *F. carica* na intensidade da cauda do DNA em células SH-SY5Y expostas à rotenona (250nM). Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p<0,05$ e ** $p<0,001$217

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Macro e micronutrientes do figo (por 100 g de parte edível)	8
Tabela 2. Estrutura química dos principais ácidos orgânicos existentes nas plantas	12
Tabela 3. Estrutura dos aminoácidos essenciais existentes em plantas	15
Tabela 4. Estrutura dos aminoácidos não essenciais existentes em plantas.....	16
Tabela 5. Estrutura química dos principais ácidos gordos saturados	21
Tabela 6. Estrutura química dos principais ácidos gordos monoinsaturados.....	21
Tabela 7. Estrutura química dos principais ácidos gordos polinsaturados.....	22
Tabela 8. Estrutura química das principais classes de flavonoides	30
Tabela 9. Estrutura química de algumas cumarinas existentes na Natureza.....	32
Tabela 10. Compostos fenólicos identificados em frutos e folhas da espécie <i>F. carica</i> ...	42
Tabela 11. Fitosteróis identificados em frutos, folhas e látex da espécie <i>F. carica</i>	46
Tabela 12. Compostos voláteis identificados em frutos e folhas da espécie <i>F. carica</i>	54
Tabela 13. Ácidos orgânicos encontrados em <i>F. carica</i>	172
Tabela 14. Compostos fenólicos encontrados nas folhas e frutos de duas cultivares brancas de <i>F. carica</i>	181
Tabela 15. Compostos fenólicos presentes nos extratos metanólico e de acetato de etilo de folhas e frutos (casca e polpa) da cultivar “Pingo de Mel” de <i>F. carica</i> (mg/Kg, peso seco)	190
Tabela 16. Compostos voláteis nas folhas, frutos e látex de cultivares de <i>F. carica</i>	200

Tabela 17. Atividade antioxidante de duas cultivares brancas de <i>F. carica</i>	208
---	-----

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAT	Álcool aciltransferase
ACCase	Acetil-CoA carboxilase
AChE	Acetilcolinesterase
ACP	Proteína transportadora de acilo
ADH	Álcool desidrogenase
AER	Aleno óxido redutase
AOC	Aleno óxido ciclase
AOS	Aleno óxido sintase
ANS	Antocianidina sintase
BCl ₃	Tricloreto de boro
BF ₃	Trifluoreto de boro
BuChE	Butirilcolinesterase
CA2H	Cinamato 2-hidroxilase
CA4H	Cinamato 4-hidroxilase
CAS	Cicloartenol sintase
CAT	Catalase
CCD	Carotenoide dioxigenase
CCO	Carotenoide oxigenase
CHI	Chalcona isomerase
CHS	Chalcona sintase
4CL	4-Cumarato:coenzima A liase
CO2H	4-Ácido cinâmico 2-hidroxilase
DA	Doença de Alzheimer
DAD	Detetor de matriz de díodos
DAHPP	3-Desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dubelco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cpDNA	Ácido desoxirribonucleico cloroplastidial
DOXP	1-desoxi-D-xilulose fosfato
DOXR	Redutoisomerase de 1-desoxi-D-xilulose fosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	Impacto eletrônico

ESI	Ionização por eletrospray
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FAS	Ácido gordo sintase
FBS	Soro bovino fetal
F3H	Flavanona 3-hidroxilase
FLS	Flavonol sintase
F6P	Frutose-6-fosfato
FPP	Pirofosfato de farnesilo
FS	Flavona sintase
GA-3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GPP	Pirofosfato de geranilo
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
HCl	Ácido clorídrico
HCT	Hidroxicinamoyl transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HO ₂ •	Radical hidroperóxido
HOCl	Ácido hipocloroso
HPL	Hidroperóxido liase
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a detetor de matriz de díodos
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a espectrometria de massa
HS	Espaço de cabeça
IC ₂₅	Concentração inibitória de 25% da reação
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da reação
INE	Instituto Nacional de Estatística
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JMT	Metiltransferase do ácido jasmónico

KOH	Hidróxido de potássio
LAS	Lanosterol sintase
LDH	Lactato desidrogenase
LDHe	Lactato desidrogenase extracelular
LOX	Lipoxigenase
MEP	2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
MS	Espetrometria de massa
MVA	Via acetato/mevalonato
m/z	Relação massa/carga
NADH	Dinucleótido de β -nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADPH	Dinucleótido de β -nicotinamida e adenina fosfato (forma reduzida)
NaOH	Hidróxido de sódio
$\cdot\text{NO}$	Radical óxido nítrico
ODS	Octadecilsilano
$^1\text{O}_2$	Oxigénio singleto
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical anião superóxido
$\cdot\text{OH}$	Radical hidroxilo
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO^-	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PAL	Fenilalanina amónia liase
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEP	Fosfoenolpiruvato
PMS	Metossulfato de fenazina
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
RNS	Espécies reativas de azoto
RO^\cdot	Radical alcóxido
ROO^\cdot	Radical peróxido
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida

MS ⁿ	Espetros de massa em série
TIC	Corrente total de iões
TOF	Tempo de voo
UV/vis	Ultra-violeta/visível
XO	Xantina oxidase

ESTRUTURA GERAL

I. ESTRUTURA GERAL DA TESE

A presente dissertação encontra-se dividida em 4 partes principais.

PARTE I – Introdução e objetivos

Neste capítulo faz-se uma introdução aos temas focados nesta dissertação. Cada tema é abordado de uma forma geral, sendo aprofundados os aspetos mais importantes para a interpretação dos resultados obtidos, que se encontram na secção experimental. No final do capítulo são enumerados os principais objetivos da dissertação.

PARTE II – Secção experimental

Esta secção encontra-se dividida em capítulos correspondendo aos artigos publicados ou submetidos para publicação que contêm os resultados obtidos no âmbito desta dissertação e também a ensaios realizados que não foram ainda submetidos a publicação.

PARTE III – Discussão integrada e conclusões

Esta secção integra os resultados dos diferentes trabalhos e tenta relacioná-los com os estudos existentes que abordam assuntos semelhantes.

As conclusões que foi possível retirar encontram-se sumariadas neste capítulo.

PARTE IV – Referências bibliográficas

A bibliografia necessária à elaboração desta dissertação encontra-se na última secção.

PARTE I
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

2. INTRODUÇÃO

2.1. Introdução geral

As plantas constituem uma fonte valiosa de compostos com propriedades terapêuticas. Estima-se que, a nível mundial, os produtos naturais à base de plantas representem mais de 25% de todos os medicamentos de uso clínico. A elevada diversidade molecular de metabolitos em todo o Reino Planta representa um recurso extremamente rico para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (1).

Adicionalmente, os alimentos de origem vegetal são componentes importantes de uma dieta saudável, uma vez que além de possuírem baixo valor energético contêm teores consideráveis de micronutrientes, fibras, assim como uma vasta variedade de compostos biologicamente ativos (2). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que o baixo consumo de frutas e vegetais está associado com o desenvolvimento de algumas doenças. Adicionalmente, estudos epidemiológicos têm revelado uma associação benéfica entre a ingestão desses alimentos e o decréscimo da taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e determinados tipos de cancro, principalmente a nível do sistema digestivo (3). A proteção que os frutos e vegetais conferem contra essas doenças tem sido atribuída a vários antioxidantes, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol, o β -caroteno (provitamina A), os compostos fenólicos e os ácidos orgânicos. Estas substâncias diminuem o nível de stress oxidativo no organismo, prevenindo a peroxidação lipídica e o dano oxidativo de macromoléculas como o DNA e proteínas (4). Assim, para a prevenção destas doenças, a OMS e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) recomendam o consumo mínimo diário de 400 g de fruta e hortaliça (5). Neste contexto, devido à abundância de frutos, vegetais, cereais e leguminosas, a dieta mediterrânica é reconhecida como uma das dietas mais saudáveis (6).

2.1.1. *Ficus carica* L.

O género *Ficus* pertence à família Moraceae e compreende cerca de 850 espécies sendo considerado como um dos maiores géneros do Reino Planta (Figura 1). *Ficus carica* L., vulgarmente denominada figueira-comum, é a única espécie que origina frutos comestíveis, os quais possuem elevado valor nutricional. A espécie é originária da Ásia e desenvolve-se em climas tropicais e subtropicais. Em Portugal, pode ser encontrada em diferentes regiões, sendo predominante nas regiões de Bragança e Algarve (7).

As figueiras são normalmente árvores de porte mediano com cerca de 6 a 10 metros de altura, embora algumas espécies permaneçam como arbustos (8). No entanto, possuem como característica comum o facto de serem plantas lenhosas, muitas com caule de forma irregular, com raízes adventícias e superficiais. As folhas são alternas, grandes, pecioladas, profundamente lobadas (3 a 7 lobos) (Figura 1) e libertam um aroma agradável. As flores são diminutas, unissexuais, reunidas em inflorescências especiais denominadas de sicónios, consistindo num receptáculo fechado, com as flores inseridas no interior, e um orifício de saída no ápice, ou ostíolo (8). Os frutos (figos) são aquénios que amadurecem dentro do próprio sicónio. Estes possuem 3 a 5 centímetros de comprimento e podem ter uma cor verde-amarelada ou violácea dependendo do tipo de variedade cultivada (cultivar), branca ou tinta, respetivamente. Adicionalmente, estas árvores são providas de látex, uma suspensão aquosa produzida em canais laticíferos.



Figura 1. *Ficus carica* L. (Fotografias de Andreia P. Oliveira).

Esta espécie possui um dos sistemas de reprodução mais curioso da natureza. Como as flores se encontram encerradas nos sicónios, não têm contacto direto com o ambiente externo, e consequentemente, o pólen não pode ser transferido entre plantas de forma espontânea. Assim, existem várias espécies de vespas polinizadoras que procuram sicónios com flores femininas maduras para depositar os seus ovos. As larvas, ao eclodirem, alimentam-se dos tecidos internos do sicónio. Quando atingem a fase adulta, os machos fecundam as fêmeas e, mais tarde, morrem, sem saírem dos figos, pois somente as vespas femininas têm asas. Após terem sido impregnadas de pólen, as fêmeas saem dos figos e procuram outro sicónio com flores femininas para depositar os seus ovos e, assim repetir o ciclo de vida. As sementes, necessárias à propagação das figueiras, são formadas a partir das flores polinizadas (9).

Para além do seu valor nutricional, a medicina tradicional recorre frequentemente ao uso dos diversos materiais de *F. carica* (folhas, frutos e látex). As folhas, sob a forma de infusão, são utilizadas como anti-helmínticos e no tratamento de dermatites e hemorroides (10). Os frutos são utilizados como antitússicos, anticarcinogénicos e no tratamento da diarreia (10) e o látex é usado no tratamento de verrugas e dermatites (10).

2.1.2. Valor nutricional do fruto

Os frutos frescos são dos alimentos mais atrativos à vista e ao paladar e, tal como os produtos hortícolas, carecem de valor energético uma vez que são muito pobres em proteínas e gorduras (11). Os figos são uma fonte importante de nutrientes como as vitaminas A, C e B6, carotenos, ácido fólico, fibras, potássio, cálcio e fósforo, apresentando um elevado conteúdo em água (12). Na Tabela 1 encontram-se dados relativos à composição nutricional do figo.

Tabela 1. Macro e micronutrientes do figo (por 100 g de parte edível)*

Energia		Água (g)	Gordura (g)		Macronutrientes (g)							
Kcal	KJ			Proteína	Hidratos de carbono	Mono + dissacarídeos	Ácidos orgânicos	Álcool	Amido	Fibra alimentar		
70	292	79,1	0,5	0,9	16,3	16,3	0,17	0	0	2,3		
Ácidos gordos (g)					Colesterol		β-Caroteno (µg)		Triptofano/60 (µg)			
Saturados		Monoinsaturados		Polinsaturados	Trans	Ácido Linoleico						
0,1		0,1		0,2	0	0,2		0	50	7,0		
Vitaminas (µg)												
α-Tocoferol		A (eq. Retinol)		B1	B2	B3	B6	B9	B12	C	D	
770		8,0		33	20	300	110	7	0	1000	0	
Minerais (mg)												
Cinza		Sódio		Potássio		Cálcio		Fósforo		Magnésio	Ferro	Zinco
610		3		168		35		29		20	0,6	0,1

*Fonte: Tabela de composição de alimentos – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

2.1.3. Importância económica do fruto em Portugal

De acordo com as Estatísticas Agrícolas de 2010 (INE), o figo é um dos frutos mais produzidos em Portugal, com valores próximos a 3000 toneladas/ano (Figura 2). Relativamente à evolução do volume de produção deste fruto no período de 2007 a 2010, verificou-se um decréscimo de 7,8% no ano de 2008, uma recuperação de 3,6% em 2009 e um decréscimo de 6,5% em 2010, ficando abaixo do volume de produção de 2007 (13, 14).

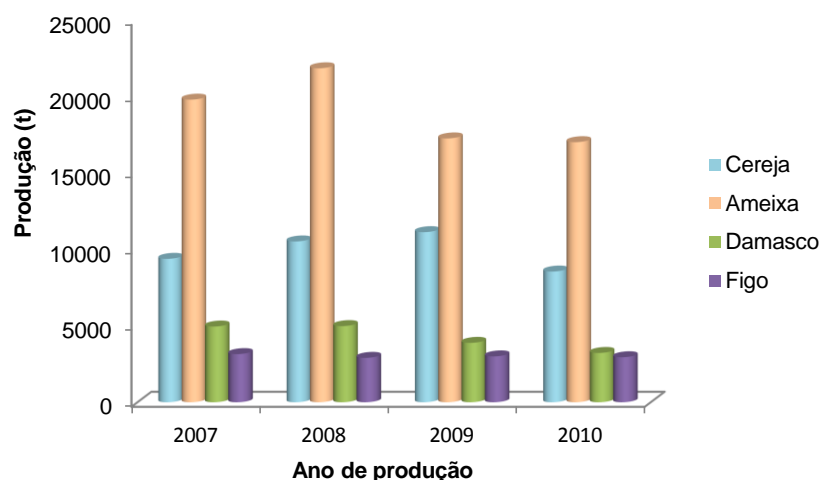


Figura 2. Produção de árvores de fruto em Portugal continental nos anos de 2007 a 2010.

2.2. Caracterização do metaboloma

As plantas produzem metabolitos primários e secundários que apresentam diversas funções. Estes metabolitos são produto de diferentes vias metabólicas, onde precursores simples são sintetizados, por intermédio de enzimas catalisadoras, dando origem a moléculas complexas. O metabolismo primário envolve compostos como os aminoácidos, os açúcares de cadeia simples, as purinas e pirimidinas dos ácidos nucleicos e as clorofilas, os quais são encontrados em todas as plantas e desempenham funções metabólicas essenciais (1).

Relativamente ao metabolismo secundário, pensava-se que estes compostos eram os produtos finais do metabolismo e que não exerciam qualquer função biológica. No entanto, nas últimas décadas o interesse por estes compostos tem evoluído significativamente, sabendo-se que a produção de metabolitos secundários está associada às suas funções ecológicas, como a proteção contra insetos e outros agentes patogénicos, a defesa em resposta a condições de stress, a atração de polinizadores e

como agentes de competição planta-planta (15, 16). De acordo com a sua função, os metabolitos secundários podem ser sintetizados em estruturas glandulares ou secretoras internas (idioblastos, laticíferos, bolsas ou cavidades) ou externas, na superfície dos órgãos vegetativos e reprodutores das plantas. A Figura 3 apresenta um esquema simplificado da interação entre os dois tipos de metabolismo.

Um dos objetivos desta dissertação de doutoramento foi a análise metabolômica de *F. carica*, a qual pode ser realizada em todos os tecidos, desde células em cultura a plantas intactas, incluindo o meio circundante (17). A metabolômica pode ter uma grande variedade de aplicações, tais como a incrementação dos fluxos metabólicos em vias bioquímicas selecionadas pela engenharia metabólica, para aumentar o valor nutricional dos alimentos ou para a produção de produtos farmacêuticos (18).

Dada a importância, a disponibilidade e o papel que assumem na planta, segue-se uma breve descrição sobre a síntese e função de alguns metabolitos primários (ácidos orgânicos, aminoácidos e ácidos gordos) e secundários (compostos fenólicos, fitosteróis e compostos voláteis) que foram estudados no âmbito desta dissertação.

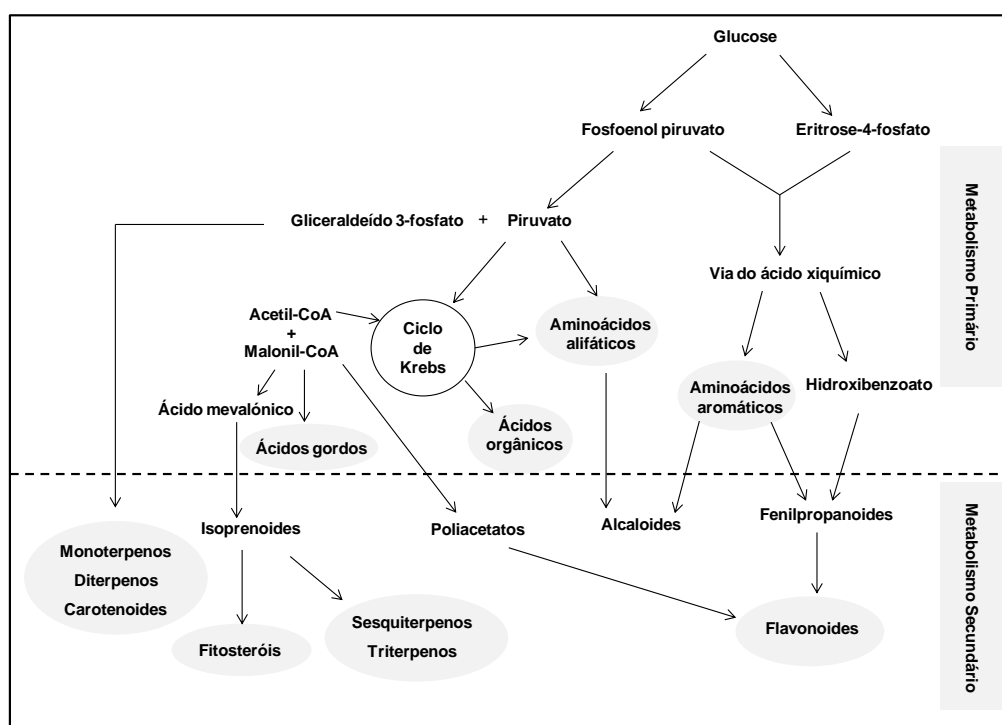


Figura 3. Esquema simplificado da interação entre metabolitos primários e secundários [adaptado de (16)].

2.2.1. Metabolismo primário

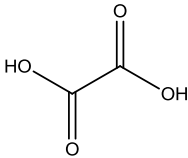
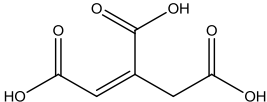
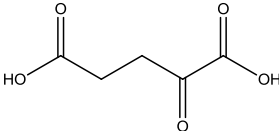
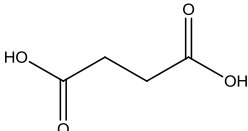
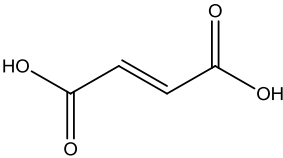
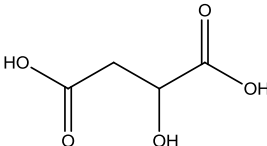
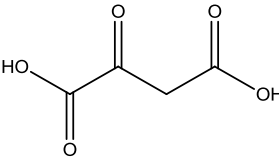
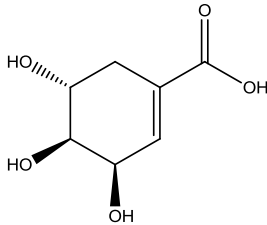
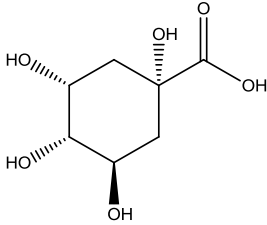
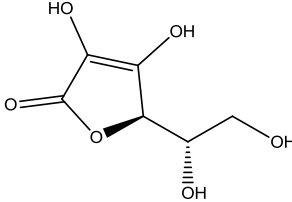
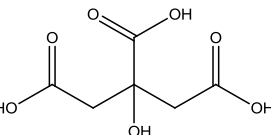
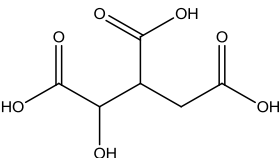
2.2.1.1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são ácidos fracos, solúveis em água e etanol, que podem ser encontrados nos vacúolos celulares de várias plantas (19). São metabolitos de extrema importância ao nível de muitas vias bioquímicas, incluindo a produção de energia e a formação de precursores para a biossíntese de aminoácidos e de metabolitos secundários (20). Estes compostos atuam como intermediários em diferentes processos de adaptação da planta, como a adaptação a deficiências nutricionais, a diversos tipos de solos e estabelecimento de interações com diferentes microrganismos. Possuem ainda um papel relevante nos mecanismos de destoxificação interna de metais pesados (ex: alumínio) existentes nos solos, através da formação de complexos que se acumulam nos vacúolos das plantas (20). Adicionalmente, os ácidos orgânicos são reconhecidos pela sua capacidade para intercederem radicais livres e quelatarem iões metálicos, podendo por isso ser utilizados na prevenção de diversas doenças, nomeadamente aterosclerose e cancro (21). A natureza e a concentração de ácidos orgânicos são importantes fatores que influenciam as propriedades organolépticas dos frutos e vegetais, principalmente o seu sabor (22). A composição e as proporções relativas de cada ácido orgânico podem servir como marcadores taxonómicos e/ou de autenticidade de uma dada espécie podendo ser, eventualmente, usadas no seu controlo de qualidade (23).

Os ácidos orgânicos podem ser divididos em dois grupos principais: um proveniente da via metabólica principal dos organismos aeróbios, que engloba o ciclo de Krebs e a glicólise, e outro resultante da oxidação direta da glicose (24). Os ácidos cítrico, isocítrico, α -cetoglutarico, succínico, fumárico, málico, *cis*-aconítico e oxaloacético são ácidos orgânicos que integram o ciclo de Krebs (24).

Na Tabela 2 estão representadas as estruturas químicas dos principais ácidos orgânicos existentes nas plantas (20).

Tabela 2. Estrutura química dos principais ácidos orgânicos existentes nas plantas.

Ácido oxálico	Ácido aconítico	Ácido cetoglutarico	Ácido succínico
			
Ácido fumárico	Ácido málico	Ácido oxaloacético	Ácido xiquímico
			
Ácido quínico	Ácido ascórbico	Ácido cítrico	Ácido isocítrico
			

Alguns ácidos orgânicos destacam-se pelo papel fundamental que desempenham nas plantas. Assim, o ácido oxálico é importante contra o ataque de animais, insetos e outros agentes patogênicos (25). O ácido quínico contribui para a acidez de vários frutos (26) e constitui, juntamente com o ácido xiquímico, um intermediário essencial na biossíntese dos compostos aromáticos (27). Os ácidos málico, cítrico e fumárico estão diretamente envolvidos no ciclo de Krebs. Adicionalmente, o ácido málico intervém nos processos de fotossíntese, oxidação de ácidos gordos, biossíntese de lenhina e aminoácidos, fixação de azoto e absorção de fósforo e ferro (28).

2.2.1.1.1. Extração e purificação

Os solventes mais utilizados para a extração de ácidos orgânicos são a água, o metanol e misturas de etanol:água (29-31). A purificação dos ácidos orgânicos é feita recorrendo a técnicas de extração em fase sólida (SPE). Este processo separa os analitos com base na sua polaridade. Devido à hidrofobicidade da fase estacionária os compostos de média a baixa polaridade ficam retidos na coluna. No caso de matrizes dissolvidas em água ácida, os ácidos orgânicos eluem com a fase móvel, deixando retidos na fase estacionária compostos mais apolares que mantêm interações hidrofóbicas com a fase estacionária (32).

2.2.1.1.2. Separação e identificação por HPLC

A HPLC consiste numa forma de cromatografia líquida em coluna, com elevado poder de resolução, que se desenvolve a pressão elevada. A associação com diferentes técnicas de deteção possibilita a análise qualitativa e quantitativa de um grande número de compostos, tendo vindo a ser utilizada em estudos taxonómicos e definição de perfis químicos (33). A separação por HPLC é particularmente útil para a análise de compostos polares ou moderadamente polares como ácidos orgânicos (33), sendo esta feita com uma coluna de exclusão iónica, a qual consiste numa resina de troca-iónica que fraciona espécies neutras e ionizadas. Os compostos ionizados são rejeitados pela resina e eluídos ao longo da coluna, enquanto as moléculas neutras ou ligeiramente ionizadas ficam retidas. Assim é possível separar convenientemente moléculas ácidas de substâncias altamente ionizadas (34). A eluição pode ser feita em modo isocrático ou em gradiente (35). Na literatura é mais frequente a aplicação do modo isocrático para a determinação de ácidos orgânicos, sendo a fase móvel constituída por uma solução ácida diluída, geralmente H_2SO_4 0,01 N (22).

Existem várias técnicas para a deteção destes metabolitos, tais como a espectrofotometria de ultra-violeta/visível (UV/vis), fluorescência e espectrometria de massa (33). A deteção por UV a 214 nm é a mais utilizada, uma vez que estes compostos só exibem um máximo de absorção, o qual se situa próximo deste comprimento de onda. Utilizando este tipo de detetor, é necessário recorrer a padrões externos para a identificação e quantificação dos ácidos orgânicos (30).

2.2.1.1.3. Ácidos orgânicos em *F. carica*

As características organoléticas dos frutos e vegetais podem ser afetadas pelo tipo e concentração de ácidos orgânicos. Em estudos anteriores envolvendo frutos de *F. carica* foram identificados os ácidos acético, oxálico, malônico, succínico, fumárico, tartárico, glioxílico, cítrico e málico, predominando os dois últimos (36).

2.2.1.2. Aminoácidos

Os aminoácidos são metabolitos primários caracterizados pela presença de um grupo amina e um grupo carboxilo. São as unidades básicas de formação das proteínas e constituem a principal fonte de azoto nas plantas (37). Com exceção da glicina, todos os aminoácidos são assimétricos, apresentando quatro grupos diferentes ligados ao carbono α . Estes quatro grupos podem estar ligados de dois modos diferentes (imagens especulares um do outro) e desviarem a luz polarizada em sentidos opostos, dando origem aos isómeros óticos L e D (38). Nas proteínas de organismos superiores existem apenas isómeros L de α -aminoácidos (38).

Os aminoácidos existentes em frutos e vegetais são muito importantes na nutrição humana e afetam a qualidade dos alimentos, incluindo o sabor, o aroma e a cor (37). Para além da sua função primária como componentes das proteínas, os aminoácidos são metabolitos energéticos e precursores de compostos de azoto biologicamente ativos, tais como o grupo heme, glutatona, várias hormonas, nucleótidos, co-enzimas de nucleótidos e aminas fisiologicamente ativas (ex. neurotransmissores) (39). Nas plantas, estes compostos estão envolvidos no metabolismo secundário, nomeadamente na biossíntese de compostos fenólicos, alcaloides, glucosinolatos, heterósidos cianogénicos, e desempenham, direta ou indiretamente, um papel importante nas interações planta-ambiente e na saúde humana (26, 37, 40). De modo geral, os péptidos e proteínas biologicamente ativos na natureza apresentam apenas 20 aminoácidos, os quais podem ser classificados em essenciais ou não essenciais, consoante sejam exclusivamente obtidos da dieta ou possam ser sintetizados pelo organismo, respetivamente (Tabelas 3 e 4) (37).

Tabela 3. Estrutura dos aminoácidos essenciais existentes em plantas.

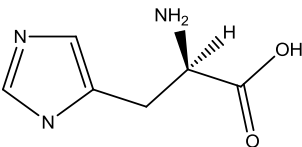
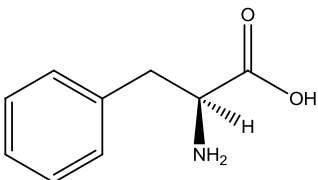
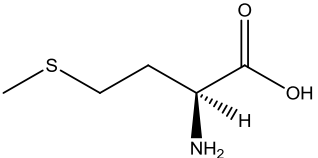
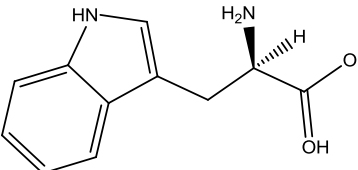
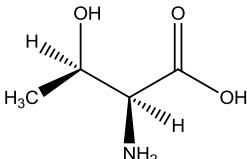
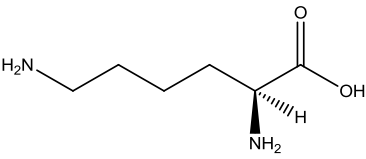
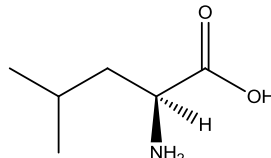
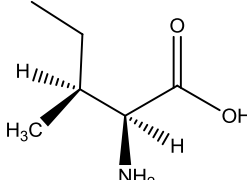
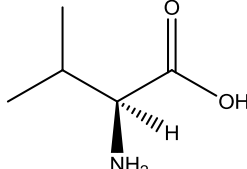
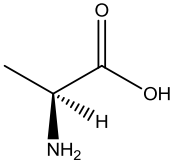
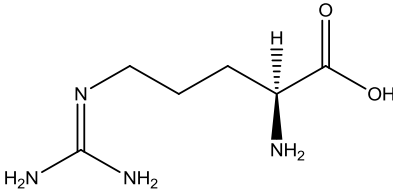
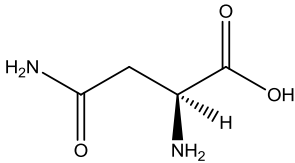
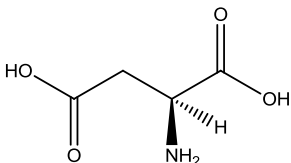
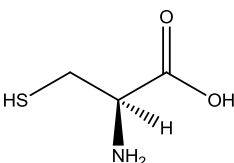
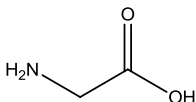
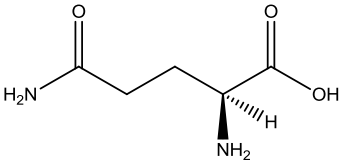
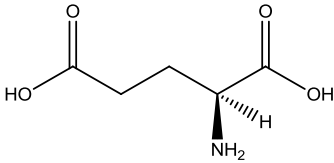
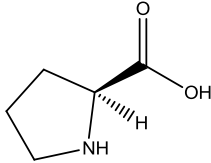
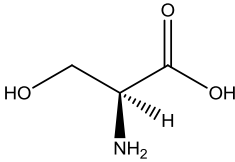
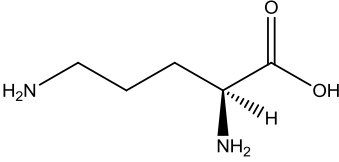
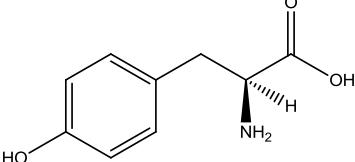
Histidina	Fenilalanina	Metionina
		
Triptofano	Treonina	Lisina
		
Leucina	Isoleucina	Valina
		

Tabela 4. Estrutura dos aminoácidos não essenciais existentes em plantas.

Alanina	Arginina	Asparagina
		
Ácido aspártico	Cisteína	Glicina
		
Glutamina	Ácido glutâmico	Prolina
		
Serina	Ornitina	Tirosina
		

2.2.1.2.1. Biossíntese

A síntese de aminoácidos nas plantas inicia-se com a redução do nitrato absorvido pelas raízes a íon amônio, o qual é incorporado em esqueletos de carbono dando origem à glutamina e ao ácido glutâmico (glutamato), que constituem as primeiras formas de azoto orgânico (41).

Os aminoácidos essenciais usam famílias de precursores metabólicos distintas e estão sujeitos à variabilidade interespecífica, o que torna a sua biossíntese mais complexa do que a dos aminoácidos não essenciais. Enquanto a valina, a leucina e a isoleucina derivam do mesmo precursor, o piruvato, a isoleucina, para além do piruvato, necessita

de treonina para a sua síntese. Por outro lado, a lisina, metionina e treonina são originadas a partir do aspartato o qual sofre uma redução no grupo β -carboxílico transformando-se em aspartato- β -semialdeído, um intermediário comum na síntese destes aminoácidos (41). Os aminoácidos fenilalanina e triptofano são sintetizados via xiquimato: reações distintas a partir do corismato levam à formação de triptofano e à síntese de fenilalanina (41).

Como referido anteriormente, a biossíntese dos aminoácidos não essenciais é menos complexa. De facto, a alanina e o ácido aspártico são sintetizados por transaminação do piruvato e do oxaloacetato, respetivamente; o ácido glutâmico é produto da redução do α -cetoglutarato, reação catalisada pela glutamato desidrogenase; a glutamina é sintetizada a partir de amónio e de ácido glutâmico; a asparagina é sintetizada de forma semelhante à da glutamina, a partir do ácido aspártico; a prolina e a arginina derivam do ácido glutâmico; a serina, formada a partir do 3-fosfoglicerato, é precursora da glicina e cisteína e a tirosina é sintetizada por hidroxilação da fenilalanina (41).

Quando presentes em excesso, os aminoácidos são degradados com o intuito de formar intermediários metabólicos importantes que possam ser transformados em glicose ou oxidados pelo ciclo de Krebs. A maioria dos aminoácidos é degradada a piruvato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, fumarato e oxaloacetato, tornando-se assim precursores da glicose, ácidos gordos e corpos cetónicos, funcionando, consequentemente, como fonte de energia metabólica (39).

A degradação dos aminoácidos inicia-se com a remoção do grupo α -amino, por reações de transaminação, dando origem a um α -cetoácido. As α -aminas são transferidas para o α -cetoglutarato para formar glutamato, o qual sofre desaminação oxidativa pela glutamato desidrogenase, originando α -cetoglutarato e ião amónio, o qual é posteriormente convertido em ureia através do ciclo da ureia (Figura 4) (42). As reações subsequentes do ciclo da ureia promovem a síntese de arginina a partir da ornitina (42).

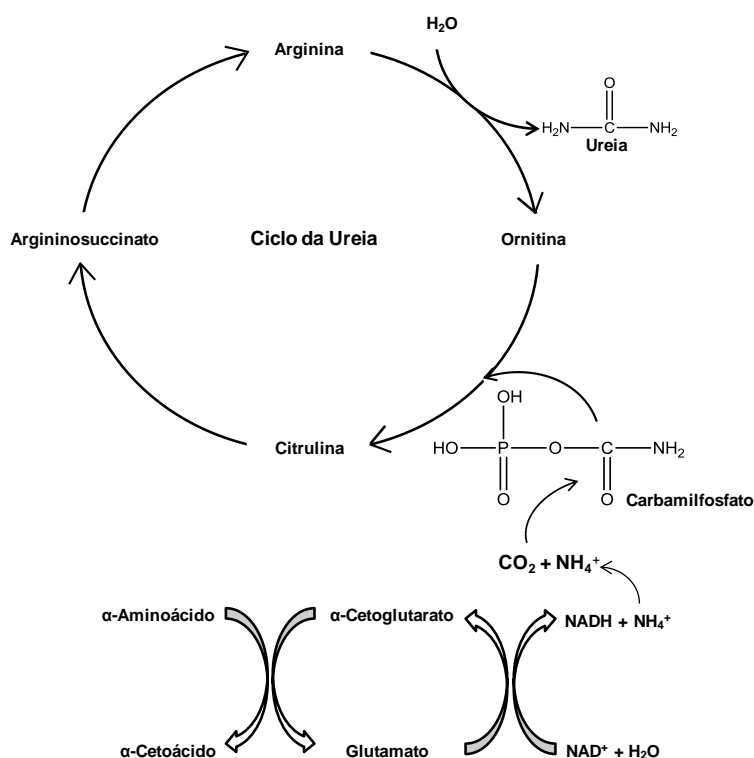


Figura 4. Conversão dos aminoácidos a ureia [adaptado de (42)].

2.2.1.2.2. Separação e identificação por HPLC

A separação dos derivados de aminoácidos é feita frequentemente por HPLC de fase reversa, usando colunas de octadecilsilano (ODS), e acetonitrilo, dimetilformamida ou outros solventes como componentes orgânicos do sistema eluente. Na maioria dos casos recorre-se a um sistema complexo de solventes, em gradiente, para se obter uma separação completa.

A sua deteção é feita normalmente recorrendo a detetores de UV/vis. Contudo, face às suas características estruturais, os aminoácidos são pouco cromóforos, sendo necessário recorrer à sua derivatização. Os processos empregues baseiam-se na reação do grupo α -amino com reagentes de derivatização, que melhoram a absorção no ultravioleta a comprimentos de onda elevados e/ou lhe conferem características visíveis ou fluorescentes. Uma relação linear é geralmente obtida entre a intensidade de absorvência/emissão e a concentração do grupo α -amino. A derivatização pode ser feita

antes ou depois da separação dos aminoácidos (derivatização pré-coluna ou pós-coluna, respetivamente) (43).

O cloreto de dabsilo (cloreto de 4-dimetilaminobenzeno-4'-sulfonilo) é um reagente fortemente corado e tem sido usado como agente derivatizante pré-coluna para determinar níveis picomolares dos aminoácidos por HPLC de fase reversa (43). Este reage rapidamente com todos os aminoácidos e os derivados formados são estáveis e reproduzíveis, tendo uma absorção máxima a 436 nm. A deteção na região do visível tem a vantagem de fornecer uma relação simples entre a concentração dos derivados de aminoácidos e a área do pico, para além de sofrer menos interferências relativamente à deteção por fluorescência (43). Para obter uma resolução adequada dos dabsilaminoácidos usa-se geralmente um tampão fosfato a pH=6,5 (44).

2.2.1.2.3. Aminoácidos em *F. carica*

A composição em aminoácidos é um indicador fidedigno do valor nutricional dos alimentos, nomeadamente dos frutos. A informação sobre o perfil destes metabolitos nos diversos materiais de *F. carica* é escassa. Contudo, com a exceção da ornitina, todos os compostos indicados nas Tabelas 3 e 4 foram já descritos nos frutos secos, predominando os ácidos aspártico e glutâmico. A hidroxiprolina foi também encontrada neste material (45).

2.2.1.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos são constituídos por cadeias hidrocarbonadas de extensão variável, com duas extremidades distintas compostas por um grupo carboxilo e um grupo metilo. Estes podem ser classificados de acordo com o seu grau de saturação em ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados. Os ácidos gordos saturados contêm uma cadeia alquílica flexível, sem qualquer ligação dupla entre os átomos de carbono; os monoinsaturados contêm uma ligação dupla e os polinsaturados contêm pelo menos duas destas ligações, podendo ser encontrados isómeros *cis* ou *trans* (38).

A nomenclatura utilizada para descrever um determinado ácido gordo fornece informação sobre o comprimento da cadeia, o número e posição das ligações duplas (46). De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) existem dois sistemas distintos para descrever a localização das ligações duplas: a designação ω , ou n , segundo a qual a contagem dos átomos de carbono tem início no carbono metílico

terminal, e a designação Δ , cuja contagem de átomos é efetuada a partir do grupo carboxilo. Tendo em consideração a posição da primeira ligação dupla, e segundo a designação n, surgem duas grandes classes de ácidos gordos polinsaturados, os n-3 e n-6, cujas primeiras ligações duplas se encontram respetivamente, entre os carbonos 3 e 4 e entre os carbonos 6 e 7 (46).

Nas plantas, a síntese de ácidos gordos é essencial para o correto funcionamento de cada célula. Estes compostos desempenham funções de armazenamento de energia, de cooperação no processo de defesa da planta contra o stress biológico e ambiental, atuam como moléculas sinalizadoras e participam na constituição das membranas celulares. Além destas, estes compostos são também importantes para a nutrição e metabolismo humano (47).

A principal função dos ácidos gordos saturados consiste no fornecimento de energia para o organismo. No entanto, estes ácidos são também componentes das membranas celulares, encontrando-se muitas vezes associados a proteínas, sendo, por isso, necessários às suas funções vitais (48). Os ácidos gordos monoinsaturados, nomeadamente o ácido oleico (18:1n-9), o qual corresponde a cerca de 92% dos ácidos gordos da dieta, são importantes na formação dos lípidos estruturais da membrana e da mielina (48).

De entre os diversos ácidos gordos polinsaturados, destacam-se os ácidos linoleico (18:2n-6) e α -linolénico (18:3n-3), os quais são obrigatoriamente adquiridos a partir da dieta, uma vez que os humanos não possuem as enzimas necessárias à sua produção (48). O ácido linoleico além de ser um componente dos lípidos estruturais da membrana é também importante na sinalização celular (48) e quando conjugado com derivados dienólicos tem capacidade para quelatar ferro, inibindo a reação de Fenton (49), e de sequestrar radicais livres (50). O ácido α -linolénico é precursor dos ácidos eicosapentaenóico (20:5n-3) e docosaheptaenóico (22:7n-3), sendo o primeiro o precursor dos eicosanóides n-3, os quais têm revelado efeitos benéficos na prevenção de arritmias, trombose e da doença coronária (51). Os ácidos gordos polinsaturados n-3 são reconhecidos pela sua capacidade para diminuir os níveis séricos de colesterol, conduzindo à redução da pressão arterial e consequentemente à diminuição do risco de doenças cardiovasculares (52). Adicionalmente, os ácidos n-3 têm particular importância porque diminuem os níveis de peróxidos lípidicos, a atividade da xantina oxidase e os níveis de óxido nítrico (53, 54).

Nas Tabelas 5, 6 e 7 estão representadas as estruturas químicas dos principais ácidos gordos saturados e insaturados existentes na natureza.





Tabela 5. Estrutura química dos principais ácidos gordos saturados.

Ácido caproico	Ácido caprílico	Ácido cáprico
$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_4-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_6-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_8-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$
Ácido láurico	Ácido mirístico	Ácido palmítico
$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{10}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{12}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{14}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$
Ácido esteárico	Ácido araquídico	Ácido beénico
$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{16}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{18}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_{20}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$

Tabela 6. Estrutura química dos principais ácidos gordos monoinsaturados.

Ácido miristoleico	Ácido palmitoleico
$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_3-\text{CH}=\text{CH}-[\text{CH}_2]_7-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_5-\text{CH}=\text{CH}-[\text{CH}_2]_7-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$
Ácido oleico	Ácido erúico
$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_7-\text{CH}=\text{CH}-[\text{CH}_2]_7-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$	$\text{H}_3\text{C}-[\text{CH}_2]_7-\text{CH}=\text{CH}-[\text{CH}_2]_{11}-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$

Tabela 7. Estrutura química dos principais ácidos gordos polinsaturados.

Ácido linoleico	Ácido γ -linolénico
	
Ácido α -linolénico	Ácido eicosapentaenóico
	

2.2.1.3.1. Biossíntese

A biossíntese dos ácidos gordos ocorre no citosol, iniciando-se com a condensação de acetil-CoA com malonil-CoA, o qual resulta da oxidação da acetil-CoA, por ação da enzima acetil-CoA carboxilase (ACCase). É depois adicionada nova unidade de dois carbonos catalizada por um complexo de ácidos gordos sintases. O produto resultante é seguidamente reduzido, desidratado e hidrogenado formando um composto de 4 carbonos que se recicla através da mesma série de passos até à produção de ácidos gordos com uma cadeia de 16 a 18 átomos de carbono (Figura 5) (55).

A ocorrência de ligações duplas nos ácidos gordos insaturados resulta de um processo microsomal que requer, além do dinucleótido de nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) e oxigénio como co-substratos, o citocromo b_5 e outros componentes de transporte eletrónico. Os ésteres da CoA, bem como os lípidos polares, tais como a fosfatidilcolina, constituem substratos para a introdução de ligações duplas, ou seja, para a dessaturação (55).

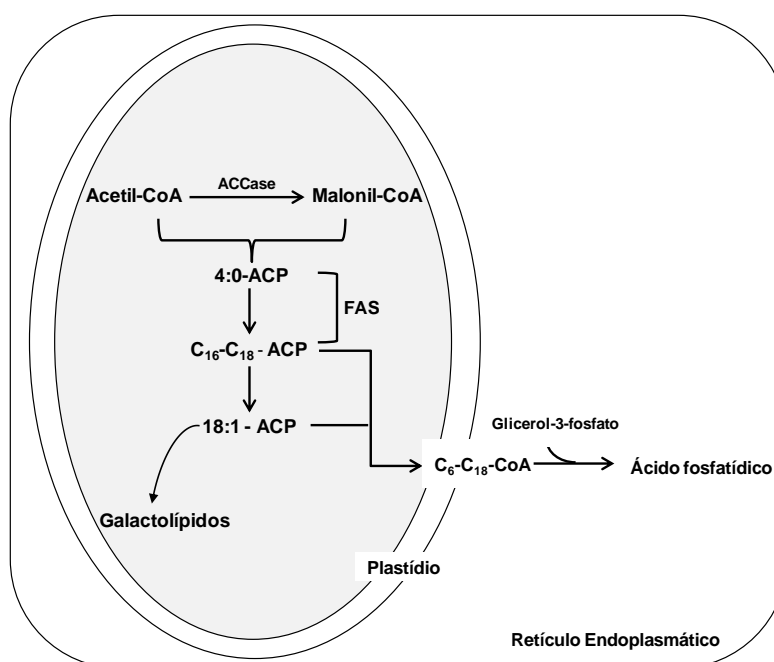


Figura 5. Esquema simplificado da biossíntese dos ácidos gordos e metabolismo dos lípidos nas plantas. ACCase, acetil-CoA carboxilase; ACP, proteína transportadora de acilo; FAS, ácido gordo sintase [adaptado de (47)].

2.2.1.3.2. Extração, purificação e separação por GC-MS

Os solventes usados para extrair ácidos gordos devem ser suficientemente polares para remover todos os lípidos das membranas celulares e suficientemente apolares para dissolver os lípidos não polares, sendo a mistura de clorofórmio e metanol na proporção 2:1 a mais utilizada (56).

A separação dos ácidos gordos é feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Neste contexto, as amostras devem ser derivatizadas para darem origem a compostos menos polares e suficientemente voláteis, passíveis de serem eluídos a temperaturas razoáveis sem sofrerem decomposição térmica ou rearranjos moleculares (57).

Existem vários métodos de derivatização, tais como a esterificação, sililação e acetilação. A esterificação pode ser feita recorrendo a um álcool apropriado, como, por exemplo, o metanol, e usando um ácido inorgânico como catalisador da reação. Os ácidos de Lewis trifluoreto de boro (BF_3) ou tricloreto de boro (BCl_3) são muito úteis para formar derivados esterificados, sendo as reações catalisadas pelo primeiro as mais rápidas (57).

Para a identificação de ácidos gordos é preciso ter em conta que muitos destes compostos se encontram na sua forma combinada, sendo necessário recorrer a técnicas de hidrólise para quebrar essas ligações. Assim, os lípidos existentes no extrato são hidrolisados com uma solução metanólica de hidróxido de potássio (KOH) a 90 °C. Os ácidos gordos livres inicialmente presentes no extrato assim como os resultantes da hidrólise alcalina são derivatizados aos respetivos metilésteres na presença de BF₃ a 90 °C. Após derivatização, os derivados são purificados com um solvente orgânico mais apolar como o isooctano (58).

2.2.1.3.3. Ácidos gordos em F. carica

Estudos efetuados com figos revelaram a abundância dos ácidos linoleico e α -linolénico. Além destes estão também descritos os ácidos mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, heptadecanóico, octacosanóico, tetradecanóico, tetracosanóico e oleico (59-62).

2.2.2. Metabolismo secundário

2.2.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de, pelo menos, um núcleo benzénico, o qual contém, no mínimo, um grupo hidroxilo, livre ou envolvido numa outra função: éter, éster ou heterósido (63, 64). Monossacarídeos como a glicose, galactose, arabinose, ramnose, ácidos glucurónico e galacturónico estão frequentemente associados a estes compostos, sendo também possível a sua presença sob formas mais complexas (di-, tri- ou tetrassacarídeos) (63).

Estes compostos constituem um dos maiores e mais diversificado grupo de metabolitos secundários das plantas, apresentando diversas funções na natureza e diferentes atividades biológicas. Pela sua ubiquidade, e simultaneamente pela presença característica dentro de determinados grupos botânicos, alguns compostos fenólicos podem ser considerados como marcadores taxonómicos, sendo utilizados no controlo de qualidade e na avaliação da autenticidade de produtos naturais (65, 66). Os compostos fenólicos estão envolvidos no crescimento e reprodução da planta, são responsáveis pela coloração das flores, dos frutos e das folhas, asseguram a proteção dos tecidos contra o efeito da radiação UV e conferem resistência contra predadores e outros agentes

patogénicos (64, 67). Para além das funções exercidas nas plantas, os compostos fenólicos fazem parte integrante da dieta e parecem estar associados a benefícios para a saúde humana, nomeadamente no tratamento e prevenção do cancro, doenças cardiovasculares e outras patologias, devido essencialmente à sua reconhecida capacidade antioxidante (67, 68). Adicionalmente, os polifenóis demonstraram capacidade de regulação do óxido nítrico, indução da expressão genética na proliferação celular e na apoptose, inibição da proliferação celular e angiogénese, modulação da atividade enzimática, estimulação do sistema imunitário, regulação do metabolismo hormonal, atividades anti-inflamatória, antibacteriana e antiviral (4, 69).

Os potenciais efeitos benéficos para a saúde dos compostos fenólicos dependem da quantidade consumida, da matriz alimentar, do tipo de glicósido e respetiva biodisponibilidade. A biodisponibilidade dos compostos fenólicos sofre influência de diversas variáveis, nomeadamente da absorção intestinal, do metabolismo pela microflora intestinal e hepático, da cinética dos compostos no plasma, da acumulação nos tecidos e da eliminação dos metabolitos (69-71).

Os compostos fenólicos subdividem-se em várias classes, sendo os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos as mais abundantes na natureza (26). A biossíntese dos derivados do ácido cinâmico, dos flavonoides e das furanocumarinas, três classes com particular relevância na espécie *F. carica*, encontra-se descrita nas secções seguintes.

2.2.2.1.1. Ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos são fenilpropanóides (C_6-C_3) que, além do hidroxilo fenólico, contêm uma função carboxilo e uma ligação dupla na cadeia lateral, a qual possibilita a existência de duas formas isoméricas, *cis* e *trans* (Figura 6). Os isómeros *trans* são os mais estáveis e os predominantes na natureza (64, 66).

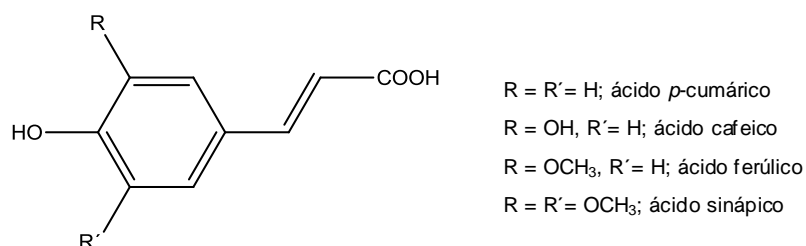


Figura 6. Estrutura dos principais ácidos hidroxicinâmicos.

Nas plantas, os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se predominantemente na forma combinada, sendo a grande variedade destes compostos o resultado da natureza das ligações e das moléculas envolvidas nessas combinações (72). Estes compostos são utilizados como blocos para a biossíntese de lenhina (73).

2.2.2.1.1.1. Biossíntese

A biossíntese dos ácidos hidroxicinâmicos nas plantas ocorre pela via xiquimato. O ácido xiquímico é um precursor dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, de alcaloides e de compostos fenólicos (64).

O ácido xiquímico resulta da condensação de uma unidade de fosfoenolpiruvato com uma unidade de eritrose-4-fosfato para formar um composto de 7 carbonos, o 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP), por ação da enzima DAHP sintase (74). A redução da cetona permite a abertura do anel que, ao voltar a ciclizar dá origem ao 3-desidroquinato (75), o qual é transformado em 3-desidro-xiquimato pela enzima 3-desidroquinase (64). Seguidamente, por ação da enzima xiquimato oxi-redutase, ocorre a redução do 3-desidro-xiquimato a ácido xiquímico (64, 76).

As enzimas 5-enolpiruvilxiquimato 3-fosfato sintase e corismato sintase são responsáveis pela transformação do ácido xiquímico em ácido corísmico (77, 78), o qual é posteriormente convertido em prefenato pela enzima corismato mutase (79).

O prefenato, por ação da corismato mutase-prefenato desidratase, origina o fenilpiruvato, o qual é posteriormente transformado em fenilalanina pela fenilpiruvato aminotransferase (79, 80). Alternativamente, na presença da prefenato desidrogenase, o prefenato é convertido em *p*-hidroxifenilpiruvato. Este composto por ação da 4-hidroxifenilpiruvato aminotransferase origina a tirosina.

A fenilalanina é o precursor dos ácidos hidroxicinâmicos na via geral dos fenilpropanóides. Esta via liga o metabolismo primário com a biossíntese de compostos

fenólicos nas plantas, pela ação sequencial da fenilalanina amónia liase (PAL), cinamato 4-hidroxilase (CA4H) e 4-cumarato:coenzima A liase (4CL). A PAL desempenha um papel chave na sequência biossintética dos fenilpropanóides, catalisando a biotransformação da L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amónia. O ácido *trans*-cinâmico é posteriormente modificado pela ação de hidroxilases e O-metiltransferases, levando à síntese dos vários ácidos hidroxicinâmicos (80-82).

A CA4H é uma enzima do citocromo P450 que catalisa o primeiro passo de oxigenação da via dos fenilpropanóides nas plantas superiores: a hidroxilação do ácido *trans*-cinâmico para originar ácido *trans p*-cumárico (83). A 4CL catalisa a conversão do *p*-cumarato e de outros *p*-hidroxicinamatos nos respetivos tioésteres de CoA, os quais são usados em muitas vias biossintéticas, incluindo a biossíntese de lenhinas, flavonoides e de vários compostos fenólicos de baixo peso molecular (84). Na Figura 7 está representada, de forma simplificada, a biossíntese de compostos fenólicos.

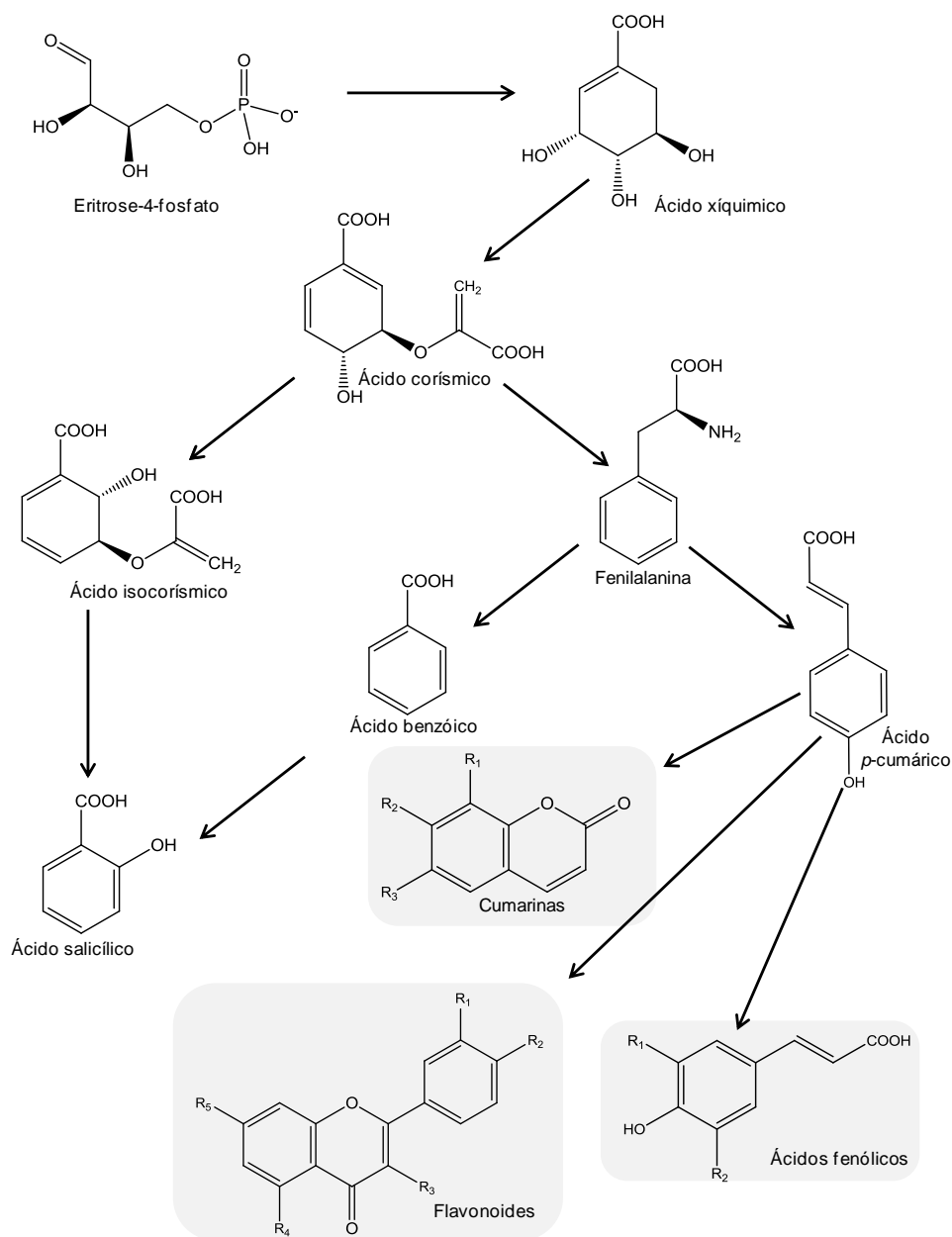


Figura 7. Representação esquemática da biossíntese de compostos fenólicos [adaptada de (85)].

2.2.2.1.2. Flavonoides

Os flavonoides representam o grupo de compostos fenólicos mais amplamente distribuído na natureza (67). Os flavonoides são difenilpropanoides, $C_6-C_3-C_6$, constituídos por dois anéis benzênicos que se encontram ligados por uma cadeia de três átomos de carbono, podendo ou não formar-se um terceiro anel. Os anéis são designados por A, B e C, e o sistema de numeração tem início no átomo de oxigênio do

heterociclo, prosseguindo até aos carbonos envolvidos na junção dos anéis (Figura 8) (64).

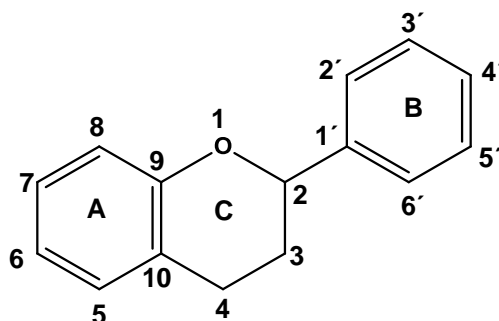
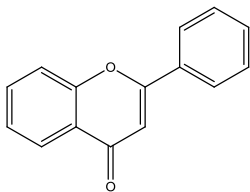
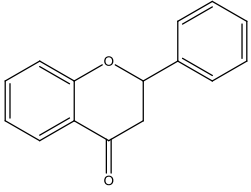
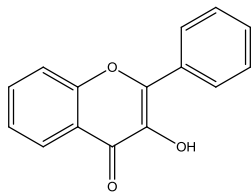
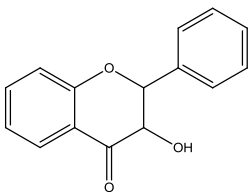
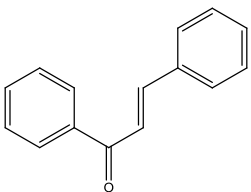
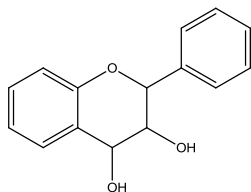
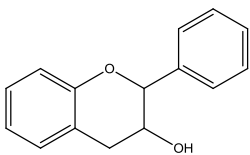
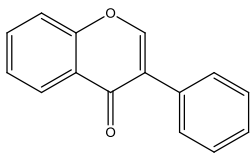
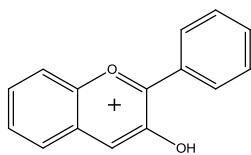


Figura 8. Estrutura química geral dos flavonoides.

Estes compostos têm uma origem biossintética mista, sendo o anel A formado “via acetato” e os anéis B e C sintetizados “via xiquimato”. Como consequência, o esquema de substituição mais frequente é a hidroxilação alternada no anel A, nos carbonos 5 e 7, e a hidroxilação *para* no anel B, que pode ser do tipo 4'-OH, 3',4'-di-OH ou 3',4',5'-tri-OH. A variedade de estruturas encontrada nas diversas classes resulta de alterações posteriores, sendo a glicosilação e a metilação dos hidroxilos as mais comuns. Outras modificações, como a metoxilação, a hidroxilação adicional, a prenilação, a metilação dos grupos *orto*-di-hidroxilo, a formação de C-glicosilflavonoides, a acilação dos hidroxilos do núcleo flavonoide ou dos açúcares que lhe estão ligados, e a dimerização surgem na natureza com menor frequência (64, 66).

De acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado (anel C), os flavonoides podem ser sub-divididos em nove classes: flavonas, flavanonas, flavonóis, di-hidroflavonóis, chalconas, flavano-3,4-dióis, flavano-3-óis, isoflavonas e antocianidinas (Tabela 8) (64, 86). De entre estas, a dos flavonóis é aquela que possui uma distribuição mais ampla (26).

Tabela 8. Estrutura química das principais classes de flavonoides.

Flavonas	Flavanonas	Flavonóis
		
Di-hidroflavonóis	Chalconas	Flavano-3,4-dióis
		
Flavano-3-óis	Isoflavonas	Antocianidinas
		

Os flavonoides podem existir na natureza na forma livre ou na forma de heterósidos, sendo esta a mais comum, uma vez que torna a molécula menos reativa e mais solúvel nos vacúolos. A glicosilação evita danos citoplasmáticos e permite o armazenamento nos vacúolos, podendo ser considerada uma forma de proteção das plantas. Esta pode ocorrer em átomos de oxigénio (grupos OH e COOH), azoto, enxofre e carbono. A componente glicosídica pode variar no número e no tipo de açúcar (87). Dependendo do tipo de ligação do grupo glicosídico, podem ser classificados em C- e O-heterósidos. Os O-heterósidos de flavonas e flavonóis constituem as classes mais abundantes (26). Nas flavonas a ligação entre a genina e o açúcar é geralmente feita através do hidroxilo na posição 7, enquanto nos flavonóis e di-hidroflavonóis são os hidroxilos nas posições 3 e 7 que estão habitualmente envolvidos nas ligações (26).

2.2.2.1.2.1. Biossíntese

Na biossíntese dos flavonoides, o primeiro passo específico é catalisado pela chalcona sintase (CHS): condensação do tioéster *p*-cumaroil-CoA com três unidades de malonil-CoA, formando-se uma chalcona. A ciclização intramolecular da chalcona é mediada pela chalcona isomerase (CHI). A naringenina resultante desta reação é um precursor essencial para a biossíntese de todas as outras classes de flavonoides (88, 89) (Figura 9). A oxidação de (2-*S*)-flavanonas a di-hidrodroflavonóis é catalisada pela enzima flavanona 3-hidroxilase (F3H). A flavonol sintase (FLS) catalisa a insaturação de (2-*R*,3-*R*)-*trans*-di-hidroflavonóis para formar os flavonóis (90). A oxidação da (2-*R*,3-*S*,4-*S*)-*cis*-leucoantocianidina catalisada pela antocianidina sintase (ANS) dá origem a 3-hidroxi-antocianidinas (91, 92). A insaturação da (2-*S*)-flavanona leva à formação de flavonas e é catalisada pela flavona sintase (FS) (64).

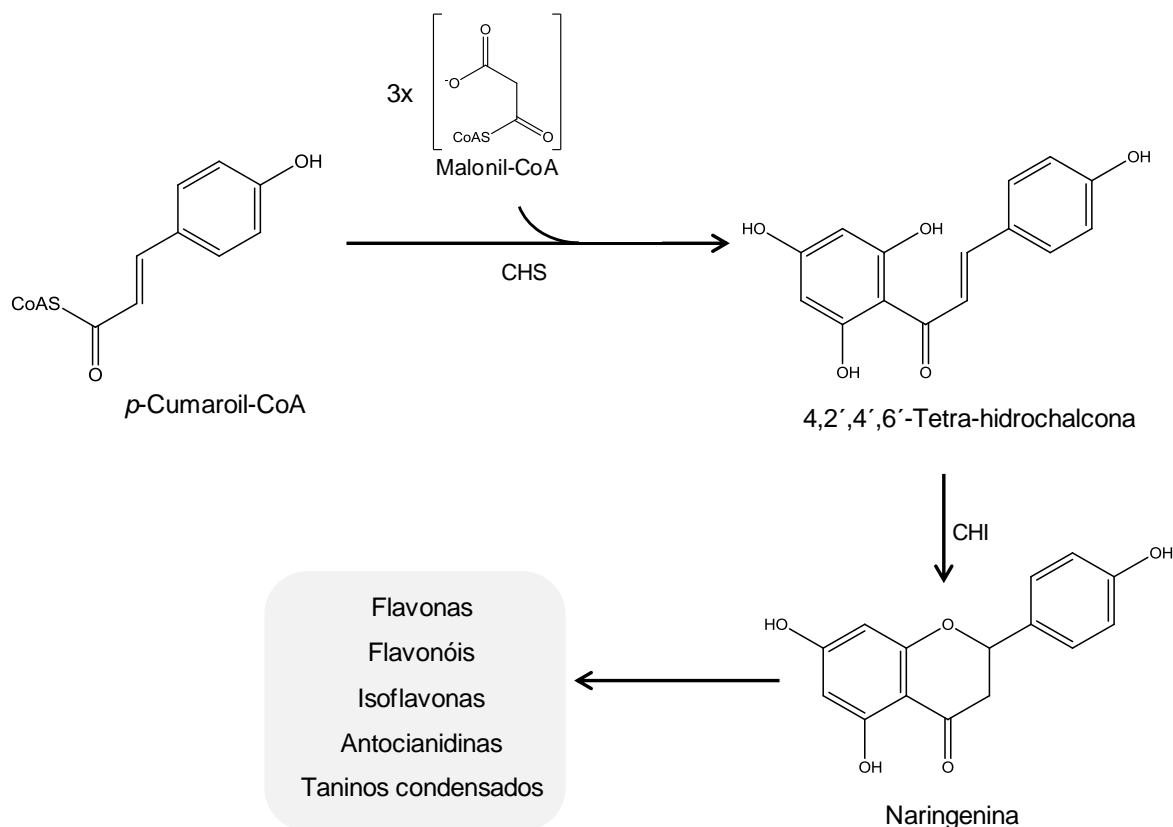
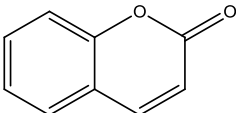
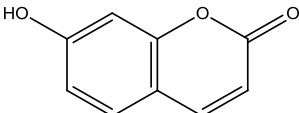
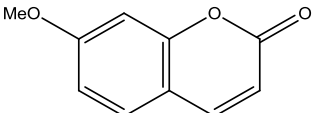
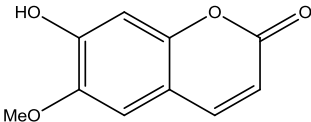
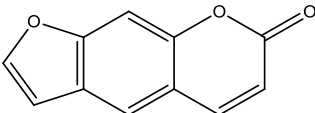
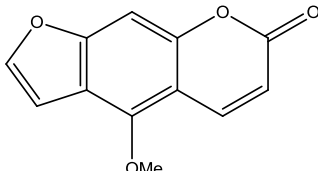


Figura 9. Representação esquemática da biossíntese de flavonoides. CHS, chalcona sintase e CHI, chalcona isomerase [adaptada de (64)].

2.2.2.1.3. Cumarinas

As cumarinas (Tabela 9), também conhecidas como benzopironas, podem ser consideradas como lactonas do ácido 2-hidroxi-Z-cinâmico (64, 93). Apesar da predominância de compostos cumarínicos simples no reino vegetal, outras subclasses destes compostos são encontrados na natureza, como as furanocumarinas simples, as piranocumarinas e as cumarinas substituídas no anel pirano (93). A biossíntese das cumarinas simples e furanocumarinas encontra-se descrita nas secções seguintes.

Tabela 9. Estrutura química de algumas cumarinas existentes na Natureza.

Cumarina	Umbeliferona	Herniarina
		
Escopoletina	Psoraleno	Bergapteno
		

2.2.2.1.3.1. Cumarinas simples

Nas plantas estão descritas mais de 700 estruturas de cumarinas simples (26), sendo a cumarina, a umbeliferona, a herniarina e a escopoletina as mais comuns (Tabela 9) (94). Entre as diversas propriedades biológicas das cumarinas simples destacam-se a atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana e anticancerígena (95, 96).

2.2.2.1.3.1.1. Biossíntese

O ácido cinâmico é o precursor biossintético das cumarinas simples, nomeadamente da cumarina e da umbeliferona (64, 94). A *orto*-hidroxilação do ácido cinâmico em ácido *orto*-cumárico e a posterior formação de um éster intramolecular (lactonização) dá origem à cumarina (94).

Na biossíntese da umbeliferona ocorre a conversão do ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico, catalizada pela enzima CA4H. O ácido *p*-cumárico é posteriormente *orto*-hidroxilado convertendo-se em ácido 2,4-di-hidroxi-cinâmico, o qual sofre lactonização originando a umbeliferona (94). Na Figura 10 encontra-se esquematizada, de forma simplificada, a biossíntese de cumarinas simples.

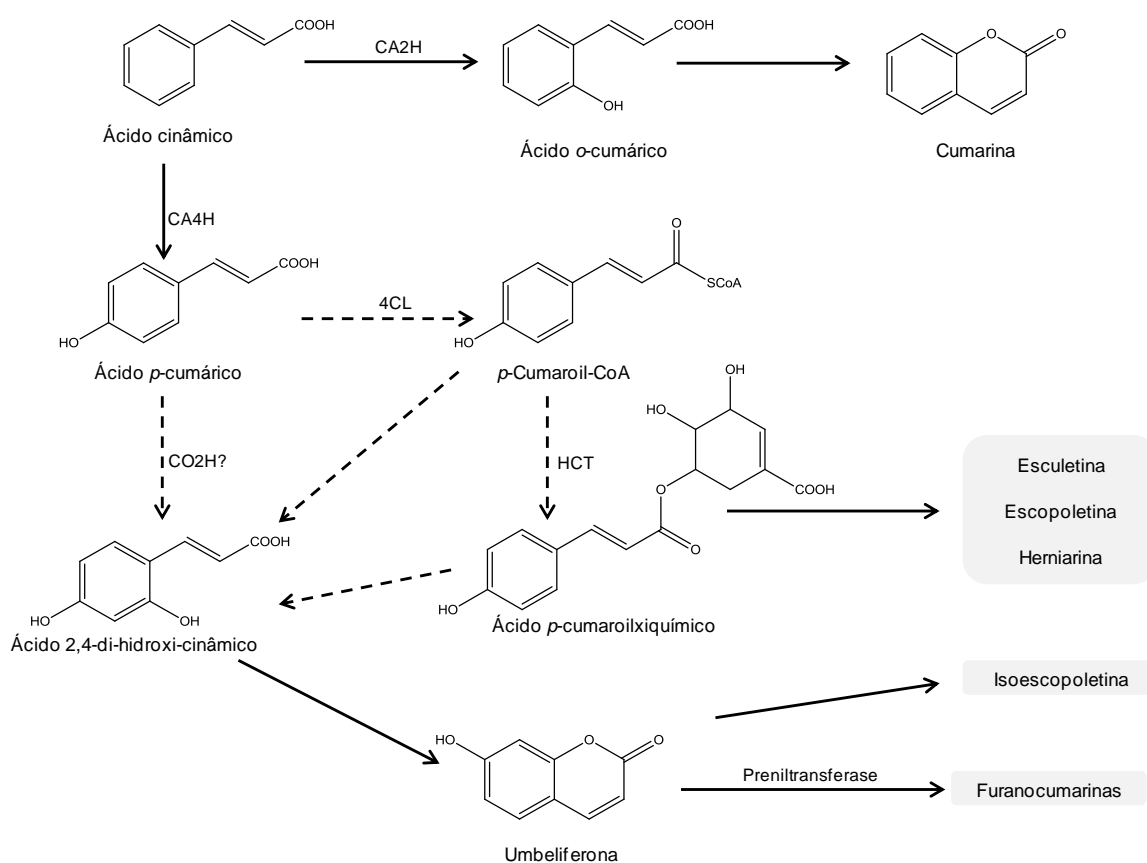


Figura 10. Esquema simplificado da biossíntese de cumarinas simples. CA2H, cinamato 2-hidroxilase; CA4H, cinamato 4-hidroxilase; CO2H?, ácido cinâmico 2-hidroxilase; HCT, hidroxicinamoil transferase; 4CL, 4-cumarato: coenzima A liase; CoA, coenzima A [adaptado de (94)].

2.2.2.1.3.2. *Furanocumarinas*

As furanocumarinas podem ser do tipo linear, quando o anel furano se liga aos carbonos nas posições 6 e 7, e do tipo angular se estão envolvidos na ligação os carbonos 7 e 8. Estes compostos são reconhecidos como potentes fitoalexinas e compostos aleloquímicos, protegendo a planta do ataque de insetos e de agentes patogénicos, como microrganismos, e participando na regulação do stress oxidativo (94).

2.2.2.1.3.2.1. *Biossíntese*

A umbeliferona é o precursor biossintético das furanocumarinas. Por ação da enzima preniltransferase, este composto sofre prenilação na posição 6 ou na posição 8, para formar demetilsuberosina ou ostenol, respetivamente (97). Na biossíntese das furanocumarinas lineares, ocorre uma oxidação da ligação dupla da cadeia lateral e um ataque eletrofílico por parte do OH na posição 7 que leva à ciclicização da demetilsuberosina, transformando-se em marmesina. Posteriormente há uma quebra da ligação oxidativa carbono-carbono para formar o psoraleno, por ação de duas enzimas do citocromo P450 (marmesina e psoraleno sintases) (64, 98, 99).

O psoraleno, por sua vez, pode ser hidroxilado pela enzima psoraleno-5-monooxigenase ou psoraleno-8-monooxigenase, dando origem ao bergaptol ou xantotoxol. Estes dois compostos podem sofrer uma O-metilação convertendo-se em bergapteno (5-metoxipsoraleno) e xantotoxina (8-metoxipsoraleno), respetivamente (Figura 11) (94).

Relativamente às furanocumarinas angulares, o ostenol sofre uma série de reações enzimáticas dando origem à angelicina, pimpinelina e à esfondina (94). Estudos sugerem que as enzimas envolvidas na biossíntese das furanocumarinas angulares podem ter surgido por uma adaptação evolutiva da via linear (94). De facto, as furanocumarinas angulares são encontradas concomitantemente com as lineares e são muito menos abundantes nas plantas, o que corrobora a ideia desta ser uma via de biossíntese secundária (94).

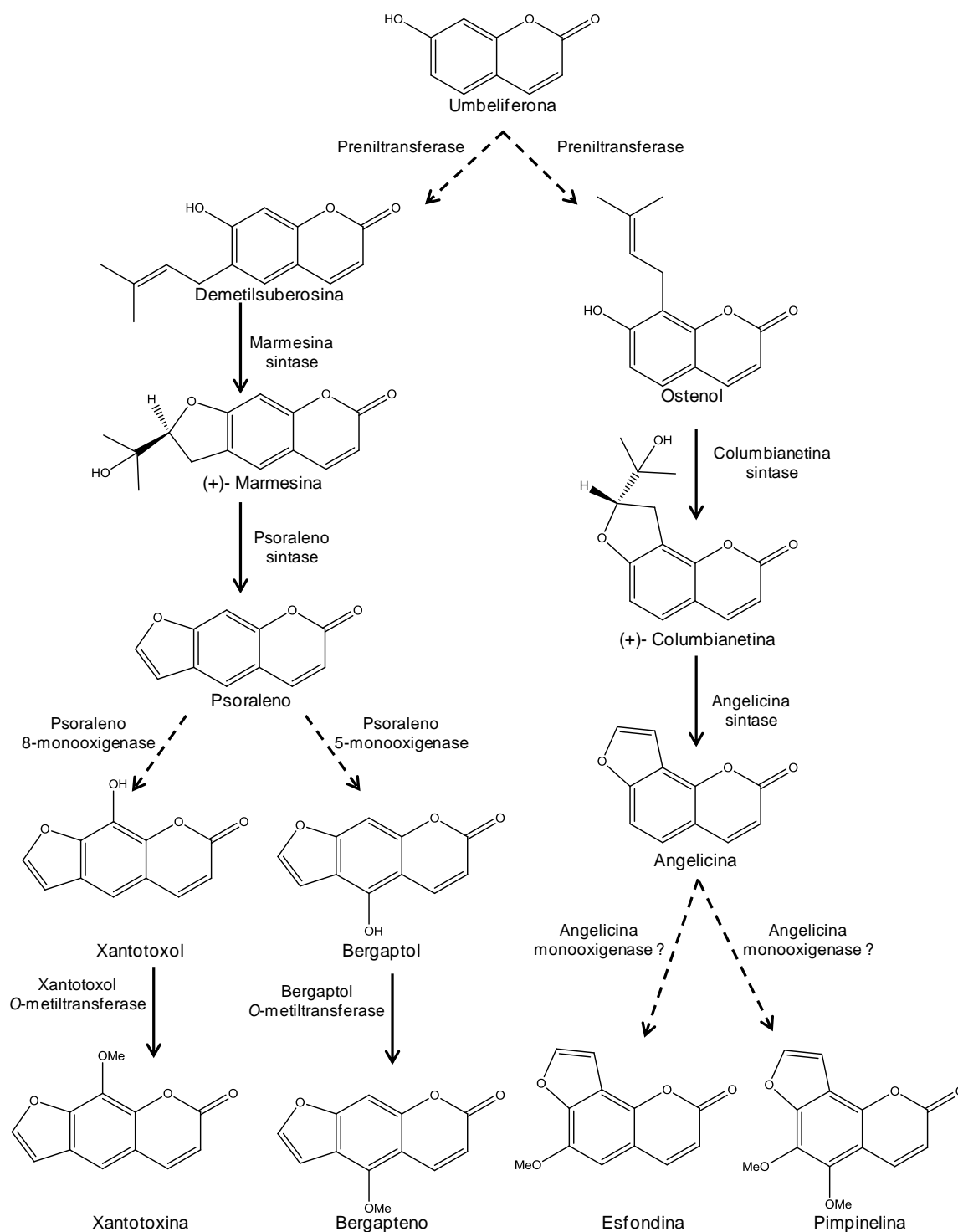


Figura 11. Representação esquemática da biossíntese das furanocumarinas [adaptada de (94)].

2.2.2.1.4. Extração e purificação

A análise de compostos fenólicos em materiais vegetais é influenciada por diversos parâmetros, tais como: as características químicas do composto, o método de extração utilizado, a natureza e o tamanho da amostra, o tempo e as condições de armazenamento, a metodologia do ensaio, o padrão utilizado e a presença de substâncias interferentes (ceras, gorduras, terpenos, clorofilas, entre outros) (100). As extrações líquido-líquido e sólido-líquido são as mais utilizadas, sendo os álcoois (metanol e etanol), a acetona e o éter etílico os solventes extratores mais usados. No entanto, para a maioria dos ácidos fenólicos é recomendada a utilização de misturas de álcool/água ou acetona/água, uma vez que estes compostos são muito polares e, conseqüentemente, dificilmente extraídos com solventes orgânicos puros (101). Para a purificação dos extratos e fracionamento dos compostos fenólicos, a técnica de SPE de fase reversa é a mais adequada (35). O extrato contendo os compostos fenólicos é redissolvido em água ácida e aplicado em colunas C_{18} . Os compostos fenólicos ficam retidos na coluna como resultado da sua interação com a fase estacionária, sendo posteriormente eluídos com um solvente capaz de quebrar essas ligações. Desta forma, obtém-se um extrato de pequeno volume contendo os compostos fenólicos concentrados e prontos para a análise cromatográfica (102).

2.2.2.1.5. Separação por HPLC

A separação dos compostos fenólicos é feita por HPLC em colunas com micropartículas empacotadas de diâmetro reduzido, normalmente de 3 a 10 μm , as quais proporcionam uma elevada superfície de contacto entre a fase estacionária e a fase móvel (102). Esta separação é baseada nas diferentes afinidades dos compostos para a fase estacionária e a fase móvel (103).

A fase estacionária pode ser do tipo normal ou reversa. Nas colunas de fase normal a polaridade da fase estacionária é superior à da fase móvel, sendo normalmente utilizadas colunas de gel de sílica. Contrariamente, nas colunas de fase reversa a polaridade da fase estacionária é inferior à da fase móvel, utilizando-se sílica modificada. As colunas de fase reversa (C_8 ou C_{18}) são as mais utilizadas para a separação deste tipo de compostos. Nestas colunas, os compostos mais polares eluem mais rapidamente do que os compostos não polares (104).

Para a separação de heterósidos flavonoídicos a coluna deve ser “end-capped”, isto é, com uma segunda funcionalização da sílica para reduzir os grupos silanol residuais, uma

vez que estes grupos interagem com os açúcares, diminuindo a qualidade da separação (105).

A presença de compostos muito semelhantes nas amostras obriga à utilização de gradientes de eluentes mais complexos e maiores tempos de separação (104, 106). Normalmente utiliza-se um gradiente com um sistema de eluentes binário, isto é, água acidificada e metanol ou acetonitrilo como modificador orgânico (106). A acidificação melhora a resolução, uma vez que os grupos hidroxilo dos flavonoides são mantidos na sua forma acídica, aumentando assim o seu tempo de residência na coluna e diminuindo o alargamento dos picos, que é causado pela desprotonação. Os ácidos mais usados são o fórmico, o acético, e mais raramente o trifluoroacético que, por serem voláteis são compatíveis com os sistemas de HPLC acoplado a espectrometria de massa (MS) (86). De entre os diversos ácidos, o ácido fórmico é aquele que normalmente origina os melhores resultados (105, 107).

2.2.2.1.6. Detecção de compostos fenólicos

Face à sua estrutura química, nomeadamente à existência de ligações duplas conjugadas e de anéis aromáticos, os compostos fenólicos absorvem na zona do UV, sendo o detetor de UV considerado como universal para este tipo de compostos. Este tipo de deteção não é destrutivo, o que representa uma vantagem quando se pretende utilizar subsequentemente um outro sistema de deteção para aquisição de mais informação, ou quando se pretende proceder ao isolamento dos compostos. No entanto, o recurso a detetores de matriz de díodos (DAD) para além de aumentar a possibilidade de identificação dos compostos, uma vez que faculta o espectro de UV e o tempo de retenção de cada composto eluído, permite o registo dos cromatogramas a diferentes comprimentos de onda com uma só injeção (108, 109). A identificação destes metabolitos é feita por comparação do espectro de UV e do tempo de retenção com as substâncias de referência; contudo, para a identificação dos derivados das geninas presentes nas amostras é muitas vezes necessário recorrer aos detetores de massa.

A combinação da cromatografia líquida com a deteção por DAD e MS é atualmente a técnica mais interessante para determinar o perfil fenólico de extratos de numerosas matrizes naturais. Os dois detetores podem fornecer informação “on-line” para cada pico individual do cromatograma, sendo possível identificar cada composto por comparação com espectros de UV/vis e de massa existentes em bibliotecas e por comparação com substâncias de referência (110).

Nas secções seguintes é apresentada uma descrição das características dos espectros de UV de ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides e cumarinas, três classes de compostos fenólicos estudadas no âmbito desta dissertação.

2.2.2.1.6.1. Espectros de UV de ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos hidroxicinâmicos absorvem em duas regiões do espectro de UV características, observando-se um máximo entre os 225 e 235 nm e outros dois, muito próximos, a 290-330 nm. A dupla absorção nesta segunda região deve-se à presença dos isómeros *cis* e *trans*, dependendo a importância de cada máximo da quantidade de cada um dos isómeros (66). Quando o padrão de substituição nos ácidos hidroxicinâmicos é simétrico, como no caso dos ácidos sinápico e *p*-cumárico (Figura 6), só existe absorção na segunda região do espectro (111).

2.2.2.1.6.2. Espectros de UV de flavonoides

Cada classe de flavonoides origina um espectro de UV/vis com uma forma característica, possibilitando com elevada frequência uma identificação imediata. A análise por HPLC-DAD é frequentemente utilizada para fazer a identificação e quantificação por grupos de compostos flavonoídicos.

O espectro de UV dos flavonoides apresenta geralmente duas zonas de absorção máxima: a banda I, entre os 300 e 550 nm, relacionada com o padrão de substituição do anel B e a conjugação do anel C, e a banda II, a 240-285 nm, que se deve ao anel A. A posição e a intensidade relativa dos máximos de absorção fornecem dados essenciais para o esclarecimento do tipo de flavonoide e do seu esquema de oxigenação; por exemplo, nos flavonóis o máximo de absorção da banda I encontra-se entre 328 e 385 nm (111). De uma forma geral, os substituintes das moléculas provocam desvio das bandas de absorção (111, 112), que podem ser traduzidos por:

- ✓ Desvio batocrómico, associado ao aumento da oxigenação, especialmente a hidroxilação (111, 112);
- ✓ Desvio hipsocrómico, associado a metilação e glicosilação, particularmente dos hidroxilos das posições 3, 5, 7 e 4'. Por exemplo, a quercetina (Figura 12) com substituição no carbono 3 apresenta dois máximos a 257 e 355 nm e uma inflexão a

265 nm (113); após hidrólise ácida, observa-se no espectro de UV/vis da genina um máximo na banda I a 370 nm. Nos glicósidos, a natureza do açúcar não tem qualquer influência (114);

- ✓ Presença de um máximo de absorção a 330 nm num flavonoide pode ser devida à ocorrência de ácidos cinâmicos como funções acilo;
- ✓ Presença de um segundo pico (por vezes uma inflexão) na banda II de flavonas e flavonóis deve-se geralmente à existência de um sistema 3',4'-di-hidroxilo.

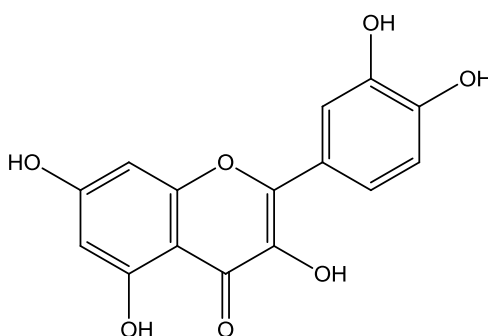


Figura 12. Estrutura química da quercetina.

2.2.2.1.6.3. Espectros de UV de cumarinas

Tal como os flavonoides, as cumarinas possuem um espectro de UV/vis característico, o qual possibilita uma identificação imediata. O espectro de UV das cumarinas 7-oxigenadas, como a 7-hidroxicumarina (umbeliferona) (Tabela 9), apresenta três zonas de absorção máxima, a 217, 315 e 330 nm, e duas inflexões a 240 e 255 nm (115).

As cumarinas 5,7- e 7,8-di-oxigenadas possuem um espectro UV similar ao das cumarinas 7-oxigenadas; no entanto, as cumarinas di-oxigenadas têm uma absorção superior na região dos 250 – 270 nm (115). O espectro de UV das cumarinas 6,7-di-oxigenadas pode ser diferenciado do das anteriores pelas duas zonas de absorção máxima que existem a 230 nm e a 340 – 350 nm (115).

As cumarinas 6,7,8-tri-oxigenadas apresentam absorção máxima entre 335 e 350 nm. O seu espectro é mais semelhante ao das cumarinas 6,7-di-oxigenadas do que ao das cumarinas 7,8-di-oxigenadas. Por outro lado, o espectro de UV das cumarinas 5,6,7-tri-oxigenadas apresenta o seu máximo de absorção entre 325 e 330 nm (115).

As furanocumarinas lineares apresentam 4 zonas de absorção máxima: 205-225, 240-255, 260-270 e 298-316 nm. Contrariamente, as furanocumarinas angulares não possuem os máximos de absorção a 240-255 e 260-270 nm, pelo que podem ser distinguidas das furanocumarinas lineares (115).

A introdução de um grupo metilo na estrutura das cumarinas resulta em pequenos desvios do seu máximo de absorção. Por exemplo, a introdução de um grupo metilo em C3 provoca um desvio hipsocrómico, enquanto, a introdução de grupos metilo em C5, C7 e C8 origina um desvio batocrómico (115).

2.2.2.1.7. Espectrometria de massa

Muitas vezes devido à complexidade das matrizes e à baixa concentração dos compostos não é possível observar o seu espectro de UV ou então a informação retirada não é conclusiva, sendo necessário recorrer à MS. Os detetores de massa são detetores universais com grande sensibilidade, que podem fornecer informação sobre a massa molecular e características estruturais de moléculas complexas.

A MS é uma plataforma analítica fundamental para a análise do perfil metabólico e, quando combinada com sistemas cromatográficos de elevada resolução permite, com elevada sensibilidade e especificidade, a deteção simultânea de vários analitos (17, 116, 117), mesmo quando estes se encontram em quantidades vestigiais ou quando não existem compostos de referência (86, 118, 119).

Esta técnica é essencialmente aplicada na determinação da massa molecular de um composto e tendo em conta a massa exata do ião molecular é possível calcular a composição elementar da substância em análise. No entanto, em muitas amostras é necessário recorrer a espectros de massa em série (*Tandem* MS/MS ou MSⁿ) para obter informação detalhada sobre as massas dos iões formados (86, 87). A MS em série compreende a seleção e isolamento de iões num intervalo estreito de massa/carga (m/z), a dissociação por colisão dos iões selecionados ou isolados, e a análise da massa dos iões obtidos (120). Da análise dos sinais resultantes da fragmentação do composto obtêm-se dados importantes para o esclarecimento da sua estrutura. Apesar de ser um método destrutivo, a necessidade de uma quantidade reduzida de composto para análise constitui uma grande vantagem (121). Normalmente, o ião molecular representa o pico de maior intensidade. Além disso, é frequente a observação dos sinais $M^+ -1$, correspondente à perda de hidrogénio, $M^+ -17$, devido à perda do hidroxilo, $M^+ -18$, originado pela perda de água, e $M^+ -28$ e $M^+ -29$, indicando a perda de CO e CHO a partir da função carbonílica, respetivamente. A existência de outros radicais na molécula

também pode ser detetada pela presença dos sinais correspondentes à massa molecular subtraída da massa desses radicais (112, 122).

2.2.2.1.8. Métodos auxiliares

Muitas vezes as matrizes naturais são de tal modo complexas que é necessário recorrer a métodos auxiliares para identificar os seus compostos. Os métodos degradativos, como a hidrólise, constituem meios auxiliares na determinação estrutural de compostos, uma vez que permitem a separação das geninas dos açúcares e de grupos acilo. Para estudar os heterósidos flavonoídicos acilados pode-se proceder a 3 tipos de hidrólise diferentes: ácida, alcalina e enzimática (123).

A hidrólise ácida destina-se à rutura de ligações hemiacetálicas. Os C-heterósidos são resistentes a este tipo de hidrólise sendo passível a sua distinção dos O-heterósidos. Desta hidrólise resultam açúcares e geninas, as quais podem ser posteriormente identificadas por HPLC-DAD ou HPLC-MS. O tempo necessário para a separação da parte glicosídica de um O-glicosilflavonoide é determinado pela concentração do ácido, pela natureza do açúcar e pela posição deste na molécula.

A hidrólise alcalina é tipicamente usada em compostos acilados, ocorrendo a quebra de ligações éster, estabelecidas entre um ácido alifático ou aromático e um hidroxilo fenólico de uma genina ou um hidroxilo de um açúcar.

A hidrólise enzimática é um método útil para estabelecer a natureza da ligação do açúcar à genina (α ou β). Contudo, açúcares acilados e C-glicósidos são resistentes à hidrólise enzimática (66, 111).

2.2.2.1.9. Compostos fenólicos em *F. carica*

Os frutos da espécie *F. carica* são conhecidos por contribuírem para o teor de compostos fenólicos ingeridos numa dieta normal. Estudos realizados com figos demonstraram que o seu perfil fenólico é constituído essencialmente por ácidos fenólicos e flavonoides (Tabela 10). Estes compostos são também encontrados nas folhas, juntamente com cumarinas (Tabela 10).

Tabela 10. Compostos fenólicos identificados em frutos e folhas da espécie *F. carica*.

Classe	Frutos	Folhas
Ácidos fenólicos	Ácido 5-O-cafeoilquínico (124, 125)	
	Ácido gálico (124)	
	Ácido siríngico (124)	Ácido 5-O-cafeoilquínico (126)
	Ácido isovanílico (61)	Ácido ferúlico (126)
	Ácido <i>m</i> -cumárico (61)	
Flavonoides	Quercetina-3-O-rutinósido (124,125)	
	Quecetina-3-O-glucósido (125)	
	Quercetina-3-O-acetilglucósido (125)	Quercetina-3-O-rutinósido (126, 127)
	Apigenina-3-O-rutinósido (125)	Quercetina (128)
	Camferol-3-O-rutinósido (125)	Luteolina (128)
	Luteolina-6-C-hexose-8-C-pentósido (125)	Daidzina (129)
	(+)-Catequina (124,125)	
	(-)-Epicatequina (124,125)	
Cumarinas	Psoraleno (62)	4',5'-Di-hidropsoraleno (127)
	Bergapteno (62)	Marmesina (127)
	Xantotoxina (62)	Umbeliferona (127)
	Angelicina (62)	Psoraleno (10, 126, 127, 129)
		Bergapteno (10, 126, 127, 129)

2.2.2.2. Fitosteróis

Os fitosteróis constituem um dos principais componentes das membranas das células vegetais e têm o ciclopentanoperidrofenantreno ($C_{27}H_{48}$) como núcleo fundamental. Estes compostos desempenham funções biológicas análogas às do colesterol nas células animais. Nas plantas, estão envolvidos em processos celulares importantes: intervêm na regulação da fluidez das membranas, participam na adaptação das membranas à temperatura, na diferenciação celular e proliferação e são bases para a formação de diversos metabolitos secundários, tais como glicoalcalóides, cardenólidos e saponinas. No homem reduzem os níveis séricos de colesterol e têm efeitos positivos no tratamento da hiperplasia prostática benigna, artrite reumatóide, alergias, assim como na inibição do desenvolvimento de cancro (130). Devido às suas inúmeras funções, os fitosteróis podem ser utilizados pela indústria farmacêutica, nomeadamente na produção de esteróides terapêuticos, pela indústria alimentar, como aditivos de alimentos funcionais (131), e pela indústria cosmética, na produção de cremes e batons. Adicionalmente, tendo em conta a sua fácil absorção pelos sais biliares e pelas micelas do intestino, os fitosteróis

constituem um excelente veículo de transporte de alimentos, fármacos ou nutracêuticos (131).

Quimicamente, os esteróis vegetais apresentam analogias estruturais com a molécula de colesterol, diferenciando-se pela introdução de um grupo metilo ou etilo na posição 24. De acordo com a sua estrutura, os fitosteróis podem ser divididos em três classes: 4-demetil esteróis, 4 α -monometil esteróis e 4,4-di-metil esteróis, sendo as duas últimas classes caracterizadas por serem precursores biossintéticos das plantas e por estarem presentes em menores quantidades do que os produtos terminais, os 4-demetil esteróis. Nas plantas existem mais de 100 tipos de fitosteróis na forma livre ou esterificada, sendo o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol os mais comuns (Figura 13). O sitostanol, campestanol, brassicasterol e o Δ^5 -avenasterol são alguns dos fitosteróis que podem ser encontrados em menores quantidades nas plantas (132).

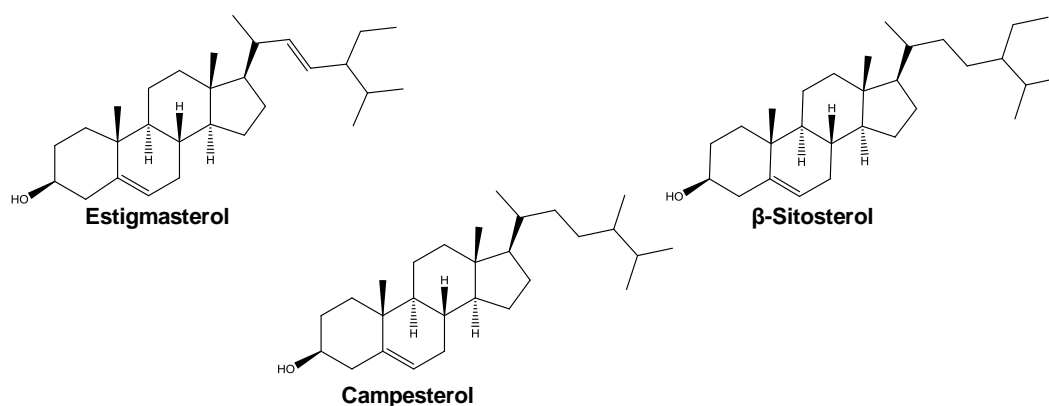


Figura 13. Estrutura química dos principais fitosteróis das plantas.

2.2.2.2.1. Biossíntese

Nas plantas, a síntese de esteróis consiste numa sequência de várias reações catalizadas por diversas enzimas que são encontradas nas membranas. O pirofosfato de isopentenilo (IPP) funciona como unidade estrutural para a biossíntese de todos os terpenóides, incluindo os esteróis que são triterpenóides (C₃₀). Na síntese de esteróis o IPP deriva da via mevalonato e é posteriormente convertido em pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), o qual serve como substrato para alongamento por uma prenil transferase, a pirofosfato de farnesilo sintase, levando à formação de pirofosfato de farnesilo (FPP). Este composto é seguidamente convertido em esqualeno (133).

A esqualeno epoxidase catalisa a epoxidação a 2,3-epoxi-esqualeno (substrato para a formação de esteróis e de uma grande variedade de triterpenos), o qual é posteriormente convertido em cicloartenol ou lanosterol pelas enzimas cicloartenol sintase ou lanosterol sintase, respetivamente. O cicloartenol, por ação da enzima cicloartenol sintase, é convertido em β -sitosterol e campesterol. A Figura 14 esquematiza, de forma simplificada, a biossíntese de esteróis.

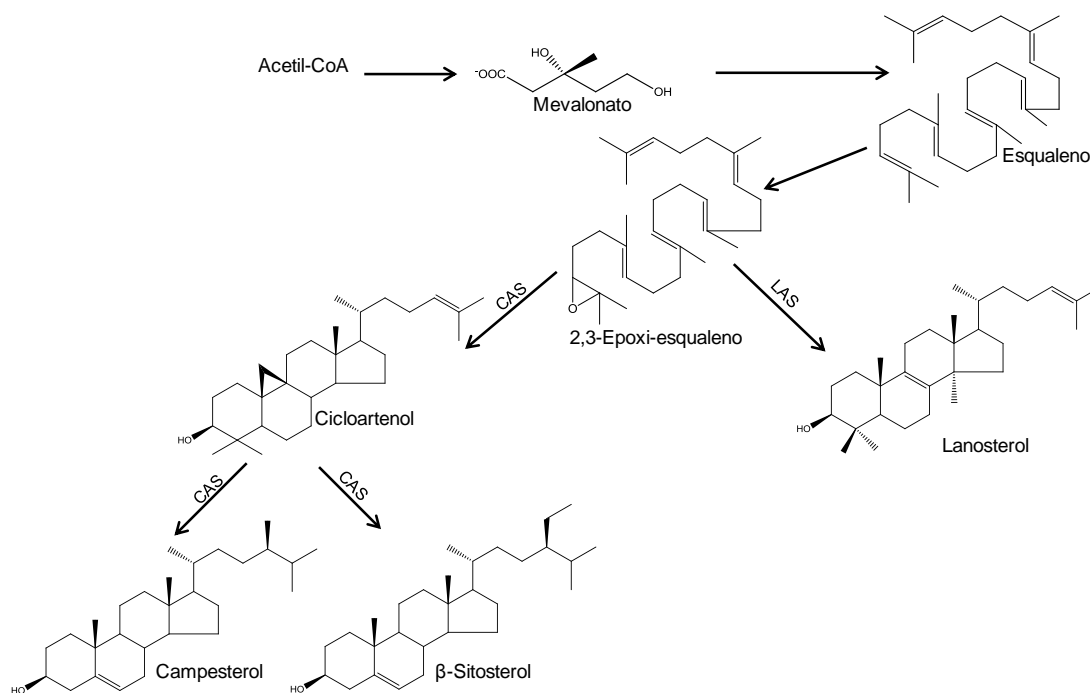


Figura 14. Esquema simplificado da biossíntese de esteróis nas plantas. CAS, cicloartenol sintase; LAS, lanosterol sintase [adaptado de (133)].

2.2.2.2.2. Extração, purificação e separação por HPLC

Os fitosteróis estão frequentemente conjugados com outros compostos como açúcares, ácidos gordos e ácidos hidroxicinâmicos, sendo necessário recorrer a diferentes tipos de hidrólise (ácida e/ou alcalina) para determinar a composição da fração livre. A hidrólise ácida destina-se à rutura de ligações hemiacetálicas e a hidrólise alcalina é tipicamente usada em compostos acilados, ocorrendo a quebra de ligações éster (Figura 15) (134).

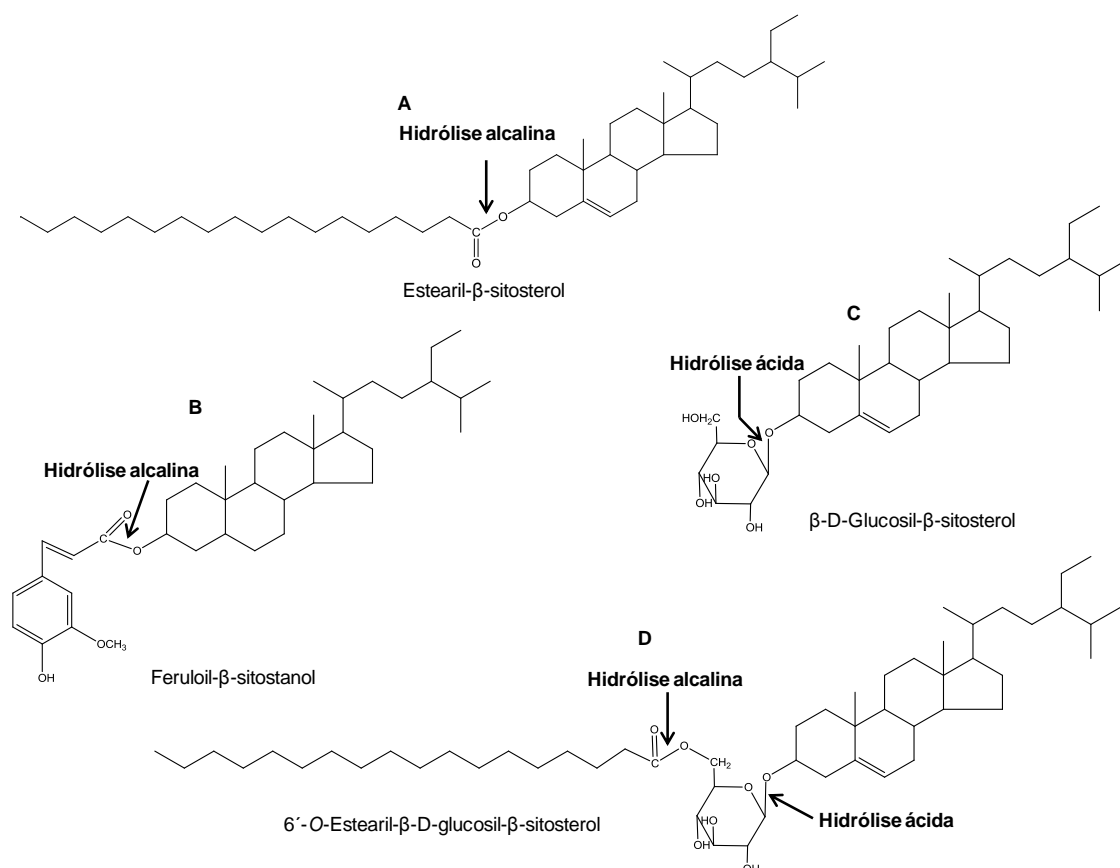


Figura 15. Locais de quebra de fitosteróis conjugados, por hidrólise alcalina e hidrólise ácida: (A) conjugação com ácido gordo; (B) conjugação com ácido hidroxicinâmico; (C) conjugação com açúcar; (D) conjugação com açúcar e ácido gordo [adaptada de (134)].

Os fitosteróis livres inicialmente presentes no extrato, assim como os resultantes de hidrólise, podem ser extraídos com diversos solventes orgânicos, como n-hexano, acetona ou misturas de clorofórmio-metanol e clorofórmio-metanol-água (135). A separação dos fitosteróis é normalmente feita por HPLC de fase reversa em colunas de ODS usando a mistura metanol:acetonitrilo (30:70) como eluente. A detecção é feita normalmente por DAD. No entanto, muitas vezes é necessário recorrer aos detetores de massa para identificar estes metabolitos (136).

2.2.2.2.3. Fitosteróis em *F. carica*

Os diversos materiais da espécie *F. carica* são conhecidos por possuírem fitosteróis. Na Tabela 11 estão descritos os fitosteróis identificados nos frutos, folhas e no látex, os quais são caracterizados por elevados teores de β -sitosterol.

Tabela 11. Fitosteróis identificados em frutos, folhas e látex da espécie *F. carica*.

Material vegetal	Fitosteróis
Frutos	Campesterol (60, 62)
	Estigmasterol (60-62)
	β -Sitosterol (60-62)
	Estigmastanol (61)
	Fucosterol (60)
	Baurenol (59)
	Lupeol (59, 61)
	Acetato de lupeol (61)
	α -Amirina (61)
	Acetato de α -amirina (61)
	β -Amirina (61, 62)
	Acetato de β -amirina (61, 62)
	Acetato de parkeol (61)
Folhas	β -Sitosterol (59)
	24-Metileno-cicloartenol (59)
Látex	6-O-Linoleil- β -D-glucosil- β -sitosterol (137)
	6-O-Oleil- β -D-glucosil- β -sitosterol (137)
	6-O-Palmitoil- β -D-glucosil- β -sitosterol (137)
	6-O-Estearil- β -D-glucosil- β -sitosterol (137)

2.2.2.3. Compostos voláteis

Os compostos voláteis, responsáveis pelos aromas das plantas e dos alimentos, são moléculas de baixo peso molecular, em geral com baixo ponto de ebulição e pressões de vapor elevadas à temperatura ambiente. Para além destas características comuns, os diferentes grupos de compostos voláteis das plantas têm poucas semelhanças. Alguns

compostos voláteis são emitidos diretamente para o ar, como ocorre nas flores, outros encontram-se no interior dos tecidos sendo libertados durante o processamento, como, por exemplo, durante a maceração (138). Apesar de não serem essenciais para os processos metabólicos primários, muitos destes compostos são necessários à sobrevivência da planta, uma vez que atraem polinizadores para que ocorra a reprodução, atuam na defesa contra fatores bióticos e abióticos, repelindo os herbívoros e protegendo a planta contra o stress oxidativo induzido pelo ozono; participam na defesa subterrânea da planta e transportam informação para plantas vizinhas ou partes distintas da mesma planta (139, 140). Contudo, tanto a síntese como a libertação destes compostos requer um grande investimento de energia e de outros recursos (140). O perfil de compostos voláteis tem sido usado na avaliação da autenticidade de matrizes aromáticas e de produtos alimentares comercialmente disponíveis (141), na autenticação de diferentes espécies (142), assim como na realização de comparações quimiométricas de estirpes ou espécies (143).

Os principais grupos de compostos voláteis são os terpenóides, fenilpropanóides e derivados dos ácidos gordos e alcaloides. No entanto, estes compostos também podem pertencer a outras classes, tais como, alcanos, alcenos, ésteres, éteres, aldeídos, álcoois, e cetonas (138, 139). A origem, as funções e as propriedades de algumas classes de compostos voláteis encontram-se descritas nas secções seguintes.

2.2.2.3.1. Derivados de terpenóides

A classificação dos isoprenóides é feita de acordo com o número de unidades isoprénicas ($\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$): hemiterpenóides (C=5), monoterpenóides (C=10), sesquiterpenóides (C=15), diterpenóides (C=20), triterpenóides (C=30), tetraterpenóides (C=40, carotenóides) e politerpenóides (C>40) (144). Estes compostos são sintetizados *de novo* a partir da acetil CoA e piruvato. Apesar da elevada diversidade de isoprenóides, todos os terpenóides derivam do IPP e do seu isómero DMAPP, que são unidades básicas de cinco átomos de carbono cada. Estas unidades são sintetizadas em duas vias paralelas: a via acetato/mevalonato (MVA), ativa no citosol, e a via da 1-desoxi-D-xilulose fosfato (DOXP), ativa nos plastídios (145). De modo geral, os sesquiterpenos, triterpenos e esteróis são sintetizados via MVA e os monoterpenos, diterpenos e carotenóides são sintetizados via DOXP (145). Os precursores diretos dos isoprenóides, o pirofosfato de geranilo (GPP) (C10), o pirofosfato de farnesilo (FPP) (C15) e o pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) (C20) são produzidos a partir da unidade isoprénica e, por ação de terpeno sintases, convertem-se em monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Os

triterpenos e esteroides derivam da condensação de duas moléculas de FPP e GGPP, enquanto os tetraterpenos resultam da condensação de duas moléculas GGPP (Figura 16) (146).

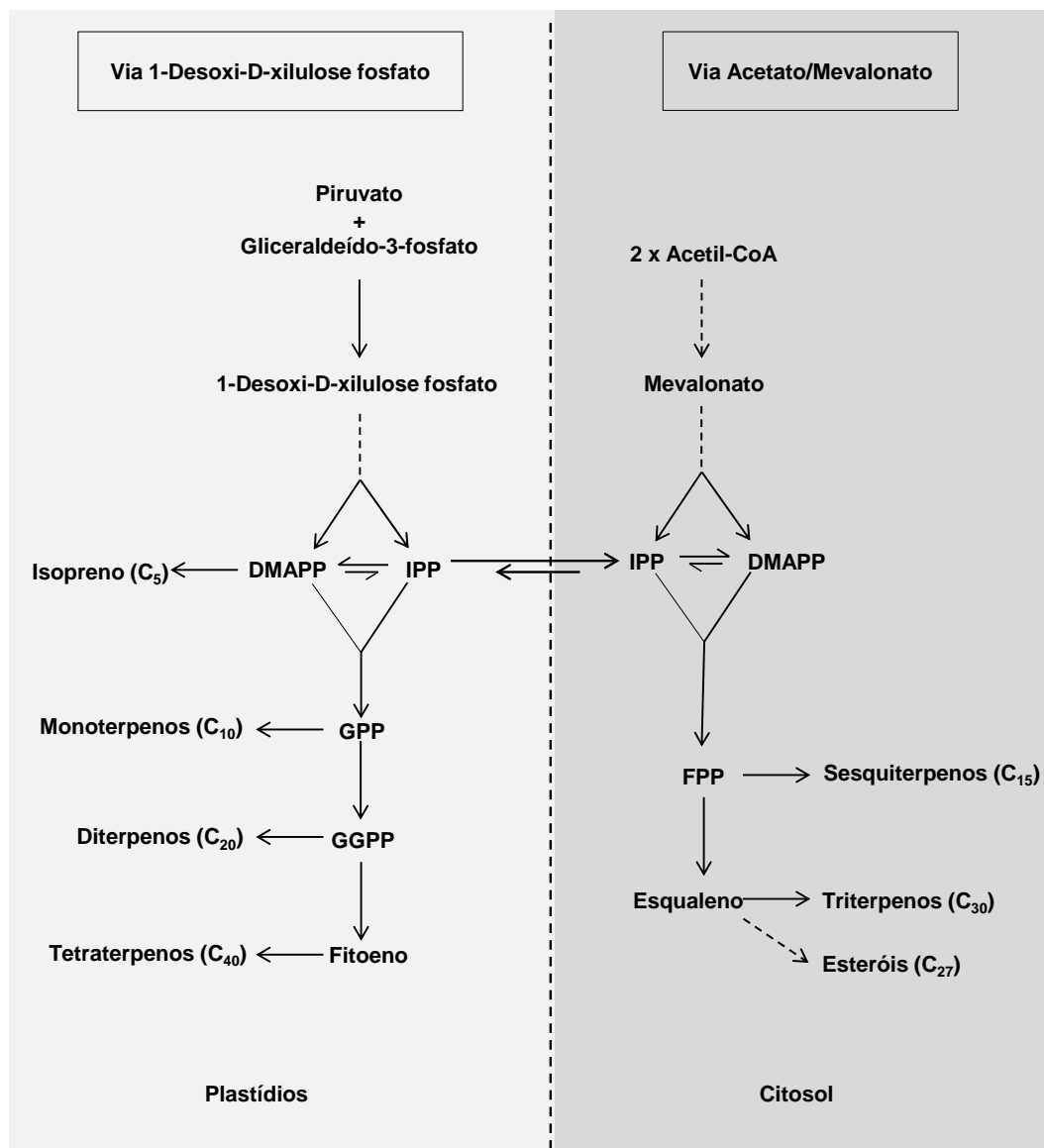


Figura 16. Esquema geral da biossíntese de terpenos. Abreviaturas: IPP, pirofosfato de isopentenilo; DMAPP, pirofosfato de dimetilalilo; FPP, pirofosfato de farnesilo; GPP, pirofosfato de geranilo; GGPP, pirofosfato de geranilgeranilo [adaptado de (146)].

2.2.2.3.2. Derivados de ácidos gordos (via lipoxigenase)

Os compostos voláteis derivados de ácidos gordos resultam de ácidos gordos insaturados C₁₈, como por exemplo o ácido linoleico e/ou o α -linolénico, e constituem uma vasta classe de compostos (147). Quando a planta é atacada, estes ácidos gordos podem ser emitidos pela membrana danificada (147). Os ácidos gordos são depois dioxigenados por lipoxigenases (LOX) e os compostos resultantes dessa reação são metabolizados por diversas enzimas, incluindo a hidroperóxido liase (HPL) e a aleno óxido sintase (AOS), que representam dois ramos da via das LOX para a produção de compostos voláteis (Figura 17) (147).

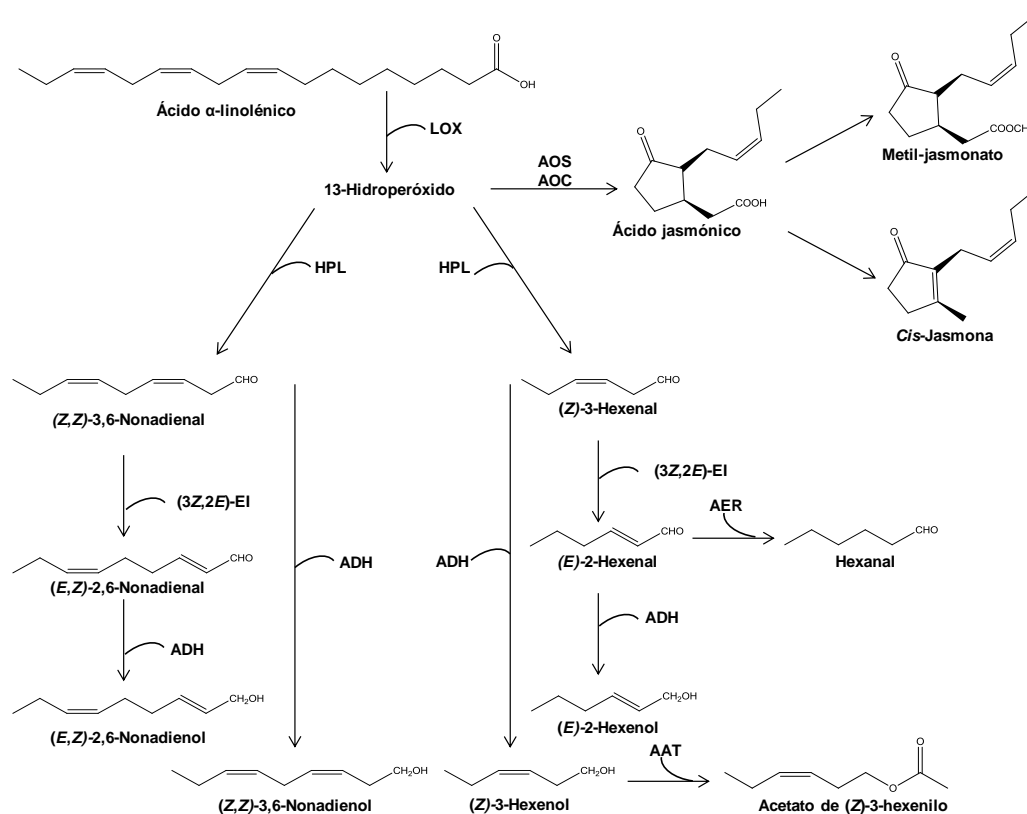


Figura 17. Biossíntese de compostos voláteis *via* lipoxigenase. AAT, álcool aciltransferase; ADH, álcool desidrogenase; AER, aleno óxido redutase; AOC, aleno óxido ciclase; AOS, aleno óxido sintase; LOX, lipoxigenase; HPL, hidroperoxidase liase; (3Z,2E)-EI, (3Z,2E)-enal isomerase [adaptada de (85)].

A quebra dos ácidos gordos, mediada pela HPL, leva à formação de aldeídos de cadeia curta (C₆ e C₉) e de álcoois voláteis (148). A emissão dos aldeídos e álcoois C₆, como por exemplo, o (Z)-3-hexenal e (Z)-3-hexenol, respetivamente, ocorre principalmente quando a folha é danificada mecanicamente (149).

No ramo da AOS ocorrem diversas reações enzimáticas que levam à formação do ácido jasmónico, que, por sua vez, pode ser convertido em metil-jasmonato, um derivado volátil (139, 150). O ácido jasmónico tem sido sugerido na literatura como um componente essencial na regulação da sequência de transdução, desencadeando a síntese e libertação de diversos compostos voláteis pelas plantas (151). Os compostos derivados do ácido jasmónico também podem estimular a produção de outros compostos e enzimas, tais como, flavonoides e nicotina, inibidores de proteases (proteínas antidigestivas) e de polifenoloxidasas (enzimas antinutritivas) (149).

2.2.2.3.3. Norisoprenóides

Os norisoprenóides são normalmente produzidos através da clivagem oxidativa e posterior modificação dos carotenóides. Estes compostos são isoprenóides não polares que possuem um sistema de ligações duplas conjugadas, o que justifica as suas propriedades antioxidantes (144). Os norisoprenóides estão envolvidos na defesa da planta, atuando como repelentes para insetos e certos animais, como agentes antimicrobianos e como fatores de crescimento (152). A vasta diversidade de norisoprenóides depende do carotenóide precursor e da posição de clivagem. A quebra pode ocorrer por processos de foto-oxigenação, auto-oxidação e de degradação térmica (via não-enzimática), ou pode ser realizada por diversas enzimas, como, por exemplo, as carotenóide oxigenases (CCO), carotenóide dioxigenases (CCD), LOX, xantina oxidase (XO), fenoloxidasas e peroxidases. A quebra dos carotenóides pode ocorrer de C9 a C13, sendo os produtos resultantes da última os mais comuns na natureza (152) (Figura 18).

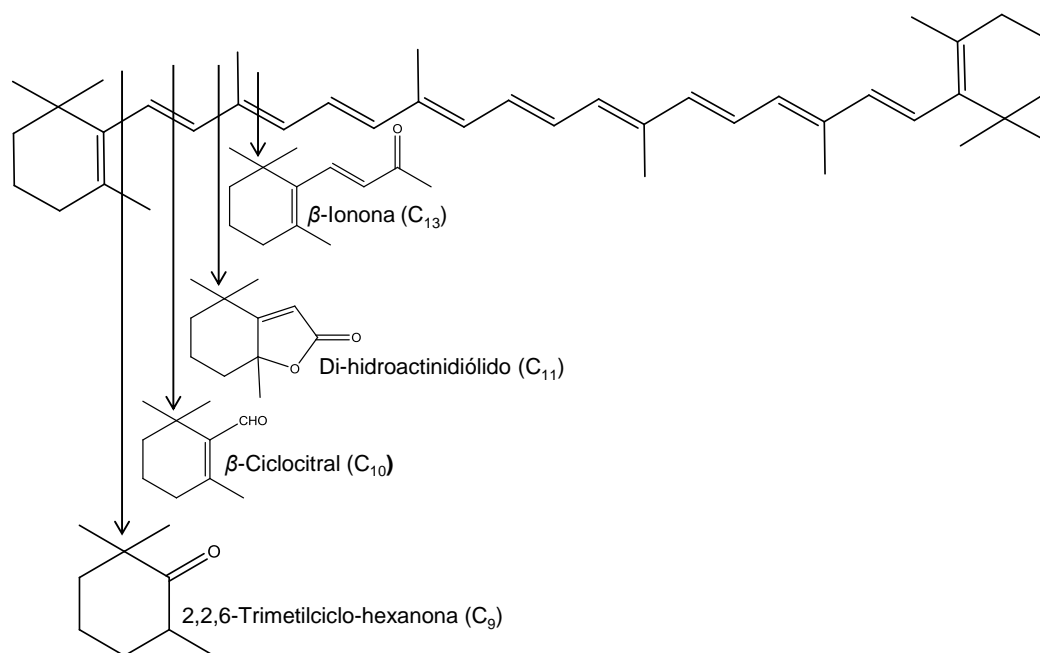


Figura 18. Produtos da quebra oxidativa do β-caroteno [adaptado de (153)].

2.2.2.3.4. Extração

Diversas técnicas de extração têm sido empregues na análise do perfil de compostos voláteis de matrizes naturais. As metodologias tradicionais, como a destilação, extração com solventes, por Soxhlet e SPE, são técnicas demoradas (é necessário purificar e concentrar o extrato) e requerem a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos (154).

Para tentar ultrapassar as limitações dos métodos tradicionais de extração da amostra, foi desenvolvida uma técnica de adsorção denominada de microextração em fase sólida (SPME) (155). Esta não envolve solventes, combina extração e concentração numa única etapa, é aplicável a diversos tipos de analitos, é sensível, reprodutível e de baixo custo (155). A técnica de SPME pode ser realizada em três métodos diferentes: injeção direta (imersão), extração no espaço de cabeça (Headspace – HS) e extração com proteção de membrana (154). A injeção direta não é aplicável a matrizes aquosas com partículas, nem a matrizes sólidas, e a extração com proteção de membrana é usada em matrizes com elevado grau de impurezas. De modo geral, a utilização de HS-SPME é indicada para analitos de média e de alta volatilidade (155). Este é o modo de SPME mais utilizado, uma vez que a ausência de contacto entre a fibra e a amostra impede a decomposição ou contaminação do revestimento da fibra e reduz o efeito da matriz (156).

A seleção criteriosa da polaridade e da espessura do revestimento da fibra permite a extração de compostos diferentes; no entanto, existem outras variáveis igualmente importantes a ter em conta, nomeadamente a agitação, a temperatura e o pH (157). A fibra é exposta à amostra e para que ocorra transferência das moléculas do analito da matriz para a fibra é necessário ultrapassar a resistência às transferências de massa do analito, até que se estabeleça um equilíbrio de partição ou adsorção (no caso de revestimentos sólidos) entre a fibra e o meio que a envolve. Realizada a extração, a fibra é retirada e inserida no injetor do cromatógrafo onde os analitos são termicamente desadsorvidos sob fluxo do gás de arraste e transportados para a coluna cromatográfica (155).

2.2.2.3.5. GC-MS

A GC é uma técnica cromatográfica amplamente usada na análise de compostos voláteis devido à sua elevada eficiência, seletividade, rapidez, simplicidade e facilidade de automatização. Adicionalmente, esta técnica requer a utilização de quantidades reduzidas de amostra e possibilita o acoplamento a outras técnicas analíticas, nomeadamente a MS (158). A combinação de GC com MS permite uma identificação mais rigorosa e vasta de compostos do que quando usadas separadamente (159). No entanto, a necessidade das amostras serem voláteis e termicamente inertes, ou, pelo menos, de se obterem derivados adequados com estas propriedades, constituem algumas limitações (160).

As amostras são injetadas numa corrente de gás inerte (por exemplo, hidrogénio, azoto e hélio) e arrastadas, sob pressão, pela coluna que contém a fase estacionária sólida ou líquida (160). As fases estacionárias líquidas são as mais utilizadas. Estas devem ser pouco voláteis, termicamente estáveis, quimicamente inertes em relação à amostra e capazes de dissolver bem todos os constituintes da amostra. Os silicones são as fases estacionárias mais utilizadas e a substituição dos seus grupos metilo por outros grupos (fenilo, ciano, trifluoropropilo) origina fases estacionárias com polaridades crescentes permitindo a separação de misturas de diversas polaridades (161).

Após atravessarem a coluna, as moléculas entram no espectrofotómetro de massa onde são ionizadas. O ionizador, analisador de iões e o detetor são três zonas distintas que constituem o espectrofotómetro de massa. Os analitos são ionizados em alto vácuo e os seus iões e produtos de fragmentação são impelidos e focados através de um analisador de massa magnética, para depois serem colhidos, sendo a quantidade de cada ião medida num detetor. A ionização pode ser eletrónica, quando recorre a um feixe

constituído por eletrões (EI – impacto eletrónico, em que os eletrões colidem com os átomos ou moléculas da fase gasosa para formarem iões) ou química, quando o feixe é constituído por iões (162). De modo geral, a ionização eletrónica leva à formação do ião molecular, pela perda de um eletrão a partir da molécula neutra, e a uma série de fragmentos. Este tipo de ionização origina espectros de massa com elevada reprodutibilidade e é especialmente adequado para compostos voláteis com peso molecular relativamente baixo (162).

No analisador os iões são sujeitos a diferentes campos elétricos e/ou magnéticos e são separados pela sua razão m/z para serem posteriormente detetados. Entre os diversos tipos de analisadores, podem ser destacados como os mais comuns os quadropolo, captura de iões, e os analisadores do tempo de voo (TOF) (162). Os detetores de ionização de chama e de condutividade térmica são os mais usuais (162).

A identificação dos compostos pode ser feita através da análise dos fragmentos, por comparação dos espectros de massa obtidos na amostra com os das substâncias de referência injetadas sob as mesmas condições, através da análise comparativa do espectro obtido com uma livreria de espectros e recorrendo aos índices de Kovats (162).

*2.2.2.3.6. Compostos voláteis em *F. carica**

O aroma dos alimentos resulta da combinação do sabor, odor, textura e das qualidades aromáticas próprias de cada um. Os frutos apresentam odores característicos que podem ser usados como marcadores taxonómicos na identificação das espécies. Na Tabela 12 encontram-se os compostos voláteis descritos nos frutos e nas folhas de *F. carica*. Nesta dissertação foram determinados pela primeira vez os compostos voláteis existentes no látex.

Tabela 12. Compostos voláteis identificados em frutos e folhas da espécie *F. carica*.

Frutos	Folhas
Benzaldeído (163, 164)	Germacreno D (164)
Álcool benzílico (164)	(Z)-3-Hexenol (164)
Salicilato de metilo (164)	Acetato de (Z)-3-hexenilo (164)
4-Etilacetofenona (164)	Salicilato de metilo (164)
Benzoato de (Z)-3-hexenilo (164)	β-Ciclocitral (164)
Pentadecano (164)	
(E)-2-Hexanal (164)	
Heptanal (164)	
Octanal (164)	
Decanal (164)	
Undecanal (164)	
(Z)-3-Hexenol (164)	
1-Hexanol (164)	
Acetato de (Z)-3-hexenilo (164)	
Nonanol (164)	
Ácido octanóico (164)	
6-Metil-5-hepteno-2-ona (164)	
2-Metil-6-metileno-1,7-octadieno-3-ol (164)	
3,7-Dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol (164)	
(Z)- e (E)-Ocimeno (164)	
Linalol (164)	
(Z)- e (E)- óxido de linalol (furanoide) (164)	
Limoneno (164)	
Holotrienol (164)	
Burboneno (164)	
Isocariofileno (164)	
Cariofileno (163, 164)	
Copaeno (164)	
α-Humuleno (163, 164)	
Germacreno D (163, 164)	
(E,E)-Farneseno (164)	
Óxido de cariofileno	
β-Cubedeno (164)	
α-Bergamoteno (164)	
β-Bisaboleno (164)	
α-Curcumeno (164)	
Furfural (164)	

2.3. Caraterização morfológica e molecular

No decorrer dos últimos anos, o estudo da biodiversidade tem sido revolucionado pelo desenvolvimento de diferentes tipos de marcadores genéticos, os quais são aplicados com sucesso na análise sistemática de plantas (165, 166). Esses marcadores podem ser agrupados em três classes principais (167):

- ✓ Marcadores morfológicos e agronômicos, ou seja, avaliados com base em caraterísticas visuais;
- ✓ Marcadores bioquímicos, que se baseiam em produtos da expressão de genes, como proteínas, em particular enzimas;
- ✓ Marcadores moleculares, que dependem da análise do material genético, o DNA.

Tradicionalmente, as caraterísticas morfológicas são utilizadas para o registo e lançamento de novas cultivares, sendo consideradas o “cartão de apresentação” de uma espécie ou de uma nova cultivar. De entre os parâmetros morfológicos vulgarmente determinados para identificar as folhas de uma dada cultivar destacam-se o comprimento e diâmetro do limbo e do pedúnculo, o número de lobos, a forma do ápice, o tipo de nervação e de rugosidade, bem como a área foliar (168). No entanto, este tipo de caraterização torna-se limitado quando se pretendem distinguir genótipos de qualidade superior, aparentados ou pertencentes à mesma espécie (169, 170). Nestas situações recorre-se à utilização de marcadores moleculares, os quais são estáveis e detetáveis em todos os tecidos, independentemente da diferenciação, do desenvolvimento do organismo, da influência do ambiente e dos efeitos pleiotrópicos (efeitos múltiplos resultantes de um único gene) e epistáticos (interações génicas) (171). Estes marcadores são úteis na seleção de genes (172), na construção de mapas genéticos (173), na identificação de cultivares e no estabelecimento de relações genéticas entre elas (174).

Os marcadores moleculares são definidos como fragmentos específicos de DNA que podem ser identificados ao nível do genoma e que diferem no seu modo de transmissão (herança nuclear bipaternal ou materna), no modo de ação dos genes (marcadores dominantes ou co-dominantes) e nos métodos de análise (marcadores por hibridação ou baseados na reação em cadeia da polimerase, PCR) (167, 175).

Para serem considerados ideais, os marcadores moleculares devem ser polimórficos e uniformemente distribuídos ao longo do genoma, ser resolutivos quanto às diferenças genéticas, gerar diferenças múltiplas, independentes e fiáveis, caraterizar fenótipos distintos e não necessitar de informação prévia sobre o genoma em estudo (167, 176). No entanto, as diferenças de princípios, metodologias e aplicações não permitem a

existência de um marcador ideal para todas as situações, sendo necessária uma escolha cuidada e direcionada de acordo com os objetivos pretendidos na análise (167, 176). Atualmente, a maioria das metodologias que recorrem a marcadores de DNA para a classificação de seres vivos baseia-se na utilização da PCR. Esta técnica compreende a síntese bi-direcional repetitiva (amplificação em milhares de vezes), via extensão enzimática, de uma determinada região do genoma moldado por dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*). Cada um dos ciclos é constituído por 3 fases: (i) desnaturação térmica do DNA; (ii) hibridação dos *primers* nas regiões complementares e (iii) extensão da cadeia pela polimerase (177).

Os cloroplastos encontrados nas folhas de plantas e algas pertencem a uma classe de organelos subcelulares denominados de plastídios (Figura 19). Aquando da diferenciação celular, os protoplastídios das células meristemáticas diferenciam-se em cloroplastos (folhas), cromoplastos (flores e frutos) e leucoplastos (tecidos de reserva). Atualmente, sabe-se que os cloroplastos possuem o seu próprio genoma e que este não é exclusivamente circular (178).

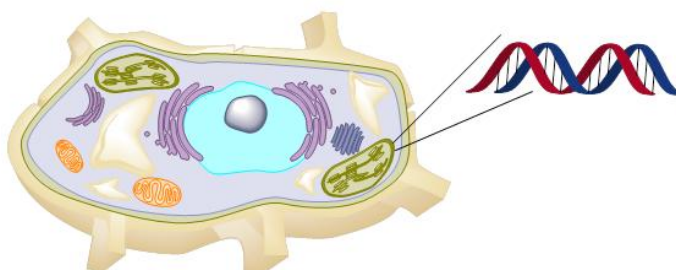


Figura 19. Representação esquemática de uma célula vegetal e localização do DNA nos cloroplastos.

Na maioria das espécies vegetais, o DNA cloroplastidial (cpDNA) possui herança materna; no entanto, em algumas angiospérmicas essa herança é biparental. O cpDNA é constituído por 120-180 Kb na maioria das plantas superiores, sendo o seu conteúdo genético extremamente conservado mesmo entre espécies filogeneticamente distantes (179). De acordo com a espécie podem ocorrer alterações estruturais no cpDNA, envolvendo o reposicionamento relativo de alguns genes; numa única célula vegetal podem existir até 10000 cópias de cpDNA. Nos últimos anos o cpDNA tem sido largamente utilizado para inferir o posicionamento de plantas em diferentes níveis taxonómicos e o seu sequenciamento direto possibilita uma análise rápida da sistemática

e evolução das plantas (179). O conhecimento da sequência de nucleótidos do cpDNA de diferentes espécies, nomeadamente a identificação de regiões polimórficas, é de extrema importância para a realização de estudos filogenéticos. Tal como foi referido anteriormente, o cpDNA é altamente conservado; no entanto, as regiões intergénicas, as junções entre as regiões codificantes, assim como as regiões invertidas, geralmente apresentam polimorfismos, podendo ser utilizadas como marcadores moleculares em programas de melhoramento genético.

As sequências de DNA não são homogéneas e essa heterogeneidade reflete-se, entre outros, na existência de regiões codificantes e não codificantes, as quais possuem ou não genes específicos para codificar uma proteína, respetivamente. De entre as diversas regiões codificantes e não codificantes do cpDNA, o gene *rbcL* e a região intergénica *trnH-psbA* são largamente utilizadas para avaliar as relações de filogenia entre as espécies (166, 179).

3. Atividades biológicas

3.1. Atividade antioxidante

A exposição contínua a diferentes tipos de espécies oxidantes conduziu ao desenvolvimento de uma vasta gama de mecanismos de defesa antioxidante, enzimática e não enzimática, por parte dos organismos aeróbios, com o intuito de neutralizar as espécies reativas e evitar os seus danos.

Vários estudos científicos demonstram que os antioxidantes naturais contidos em plantas desempenham um papel relevante para o sistema de defesa do organismo contra espécies reativas oxidantes geradas durante vários processos fisiológicos e patológicos (180, 181). Os antioxidantes são igualmente utilizados nos alimentos para retardar a formação de produtos de oxidação tóxicos, minimizar o ranço, aumentar o seu prazo de validade e manter a sua qualidade nutritiva, conferindo proteção adicional ao organismo (182). Um composto pode exercer ação antioxidante por inibição da geração de espécies reativas, ou por sequestro direto das espécies que são formadas quer *in vivo*, quer nos alimentos. Para além disso, *in vivo*, os antioxidantes podem atuar indiretamente fazendo aumentar os níveis das defesas enzimáticas (endógenas), por exemplo, estimulando a expressão dos genes codificadores das enzimas superóxido dismutase, catalase ou glutathione peroxidase (183).

Entre as diversas espécies reativas, as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as de azoto (RNS) são as mais comuns. As ROS incluem os radicais livres hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), anião superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), alcóxido (RO^{\cdot}) e peróxido (ROO^{\cdot}), assim como as espécies não radicalares peróxido de hidrogénio (H_2O_2), oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e hidroperóxidos lipídicos. De entre as diversas RNS, é possível destacar o óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$), o ácido peroxinitroso (ONOOH) e o peroxinitrito (ONOO^{\cdot}), como sendo as mais preocupantes (184). As fontes de espécies reativas mais importantes são a fosforilação oxidativa, o metabolismo pelo citocromo P450 e a ativação de células inflamatórias. As ROS e RNS produzidas endogenamente são essenciais à vida, desempenhando funções biológicas relevantes, nomeadamente na produção de energia, fagocitose, síntese de compostos biologicamente importantes, metabolismo de xenobióticos, regulação do crescimento e sinalização celular (185, 186). No entanto, a sua produção excessiva pode provocar lesão nos tecidos ou mesmo morte celular, pelo dano oxidativo causado em lípidos das membranas celulares, proteínas, incluindo enzimas, hidratos de carbono e DNA, levando à destruição membranar, modificação proteica e alteração do DNA (Figura 20). O stress oxidativo está assim implicado no desencadeamento de uma série de processos, como mutagénese, carcinogénese,

processos inflamatórios, envelhecimento, arteriosclerose, asma e diabetes (184, 185, 187).

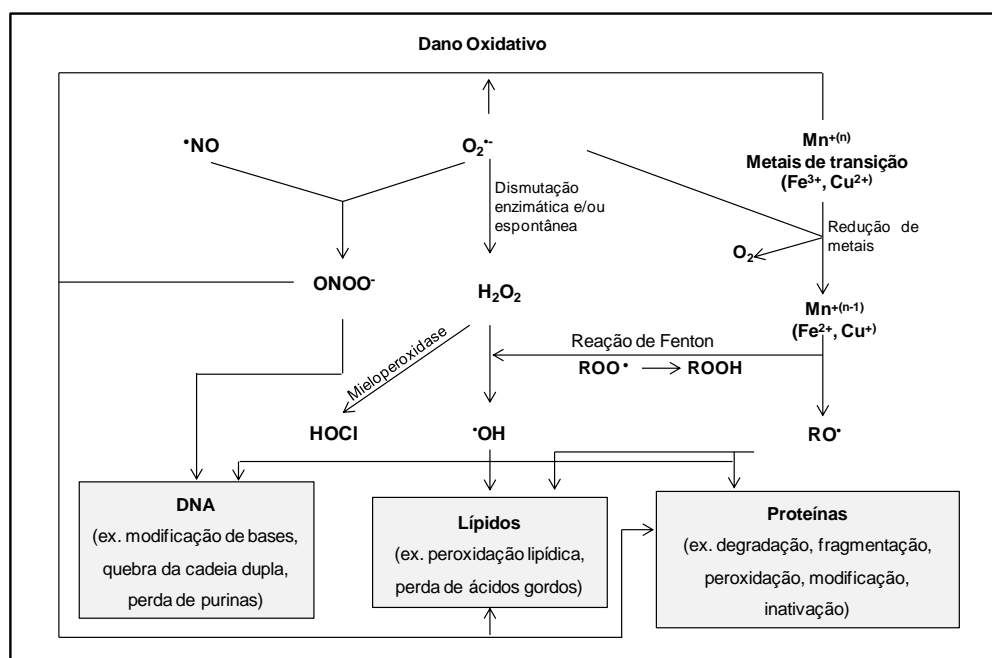


Figura 20. Dano oxidativo induzido por espécies reativas de oxigénio e de azoto: $\cdot\text{NO}$, radical óxido nítrico; $\cdot\text{OH}$, radical hidroxilo; $\text{O}_2^{\cdot-}$, radical anião superóxido, $\text{RO}\cdot$, radical alcóxido; $\text{ROO}\cdot$, radical peróxido; ONOO^- , anião peroxinitrito; H_2O_2 , peróxido de hidrogénio; HOCl , ácido hipocloroso [adaptado de (188)].

O organismo humano possui diversos mecanismos de defesa endógenos e exógenos que se complementam e atuam sobre diferentes agentes oxidantes, ou em diferentes compartimentos celulares (189, 190). As defesas antioxidantes endógenas são essencialmente enzimáticas, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e a catalase (CAT), e constituem uma linha de defesa relevante por diminuir a concentração da maioria dos oxidantes nocivos. Numa segunda linha estão moléculas que reagem com agentes oxidantes, diminuindo a sua capacidade para causar efeito deletério. Algumas dessas moléculas são provenientes do metabolismo normal, como a glutathione, ubiquinol, ácido úrico e a transferrina. As defesas antioxidantes exógenas são adquiridas da dieta, sendo as vitaminas C e E, os carotenóides e os compostos fenólicos, as mais conhecidas (Figura 21) (189, 191-193).

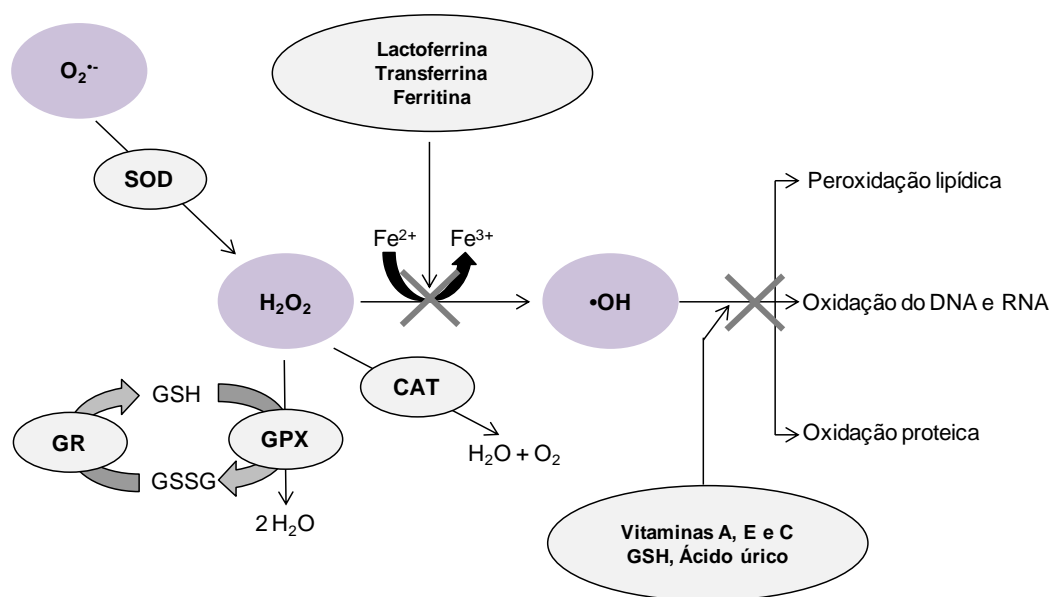


Figura 21. Representação esquemática da ação integrada de vários mecanismos (enzimáticos e não enzimáticos) envolvidos na proteção contra o stress oxidativo. SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPX, glutathiona peroxidase; GR, glutathiona redutase; GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada [adaptada de (194)].

3.1.1. Compostos antioxidantes

3.1.1.1. Ácidos orgânicos

Vários ácidos orgânicos são antioxidantes eficazes; por exemplo, o ácido ascórbico é um antioxidante hidrossolúvel fornecido exclusivamente pela dieta, o qual também pode exercer a sua atividade antioxidante em sistemas heterogêneos, desempenhando um papel importante na estabilidade dos lípidos e da riboflavina no leite (195, 196). Além disso, o ácido ascórbico é um antioxidante fundamental a nível do plasma, protegendo as membranas celulares contra a peroxidação lipídica ao interceptar o radical peróxido na fase aquosa (197). Este composto pode ainda sequestrar ou neutralizar várias ROS e RNS e atuar em sinergismo com outros antioxidantes promovendo a sua regeneração; por exemplo, pode promover a regeneração do α -tocoferol e do β -caroteno a partir das suas espécies radicalares (197-199). Porém, ensaios realizados *in vitro* demonstraram que em determinadas condições (em baixas concentrações e na presença de metais de transição), o ácido ascórbico pode atuar como pró-oxidante, uma vez que reduz cataliticamente os íons metálicos Fe^{3+} e o Cu^{2+} , que reagem com o H_2O_2 levando à formação de radicais hidroxila e alcóxido (reação de Fenton) (184, 200, 201).

Para além deste, existem outros ácidos orgânicos que podem funcionar como antioxidantes, sendo classificados como preventivos ou sinérgicos. O ácido oxálico é reconhecido pela sua capacidade para quelatar catiões multivalentes. Outros, como os ácidos tartárico, málico, cítrico, succínico e hidroxiglutárico (Tabela 2), comportam-se como antioxidantes porque também quelatam metais (21).

3.1.1.2. Aminoácidos

Os aminoácidos são um alvo importante para as espécies oxidantes nos sistemas biológicos (202), sendo o grupo amina, quando livre, o núcleo imidazol ou os grupos contendo enxofre, os locais favoritos para a sua oxidação. A natureza e extensão da molécula podem influenciar o seu grau de oxidação, sendo a histidina, cisteína, metionina, lisina e triptofano (Tabelas 3 e 4) os mais suscetíveis à ação dos agentes oxidantes (21).

Porém, tendo em conta a sua elevada heterogeneidade, os aminoácidos também podem atuar como antioxidantes por diversos mecanismos. Estes compostos quelatam metais (atividade mais marcada para os péptidos que contêm histidina na sua composição), atuam de modo sinérgico com alguns antioxidantes primários, promovendo a redução das formas oxidadas, reduzem os hidroperóxidos lipídicos a produtos não radicalares e possuem capacidade para sequestrar radicais livres, como o radical peroxilo, hidroxilo e 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) (203-206). Os péptidos apresentam maior atividade antioxidante do que os aminoácidos livres (206).

No entanto, alguns autores descreveram os aminoácidos como pró-oxidantes (203, 207, 208). Esta atividade está amplamente relacionada com as condições experimentais do ensaio, a presença de metais e o pH do meio (203).

3.1.1.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, em particular os flavonoides, possuem uma estrutura ideal para o sequestro de radicais livres e têm demonstrado serem excelentes antioxidantes, devido essencialmente à facilidade com que um átomo de hidrogénio de um hidroxilo aromático pode ser doado a um radical livre, quebrando o ciclo de geração de novos radicais, e à capacidade do composto aromático para suportar o eletrão desemparelhado por deslocalização eletrónica (71). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é também atribuída à sua capacidade para quelatar iões metálicos envolvidos na produção de radicais livres. No entanto, esta propriedade poderá conferir-lhes algum poder pró-oxidante, uma vez que podem quelatar metais de modo que a sua atividade catalítica se mantenha ou aumente (209-211). Além disso, estes compostos possuem capacidade para interagir com proteínas devido à presença de anéis benzénicos. Desta forma os fenóis são capazes de inibir algumas enzimas envolvidas na geração de radicais, como várias isoformas do citocromo P450, lipoxigenases, cicloxigenases e xantina oxidase (212-214). Estão também envolvidos no controlo da atividade de enzimas antioxidantes endógenas, como a GPX, CAT e SOD (21).

Além da atividade antioxidante direta, os flavonoides podem contribuir para diminuir o stress oxidativo pela proteção ou otimização dos compostos antioxidantes endógenos, ou pela indução de enzimas antioxidantes (71). Estudos sugerem que os efeitos celulares dos flavonoides são mediados pelas suas interações com proteínas específicas, fulcrais nas cascatas de sinalização intracelular (215). As ações de inibição ou de indução destas vias afetam profundamente as funções celulares, alterando o estado de fosforilação de moléculas alvo e modulando a expressão dos genes. Os flavonoides podem interagir com as mitocôndrias, interferir com vias metabólicas e/ou inibir a expressão de moléculas de adesão. Os efeitos celulares dos flavonoides dependem do grau com que se associam às células, pelas interações na membrana ou pela absorção para o citosol (215).

A solubilidade e a interação com as membranas são fatores que também influenciam a atividade antioxidante; por exemplo, apesar de apresentarem uma interação mais profunda com as membranas, os compostos fenólicos com elevado coeficiente de partilha óleo/água possuem menor efeito antioxidante face a radicais livres hidrossolúveis (21, 216). Nas secções seguintes serão descritas de forma detalhada as relações entre a estrutura química e atividade antioxidante de algumas classes de compostos fenólicos, nomeadamente de ácidos fenólicos, flavonoides e cumarinas.

3.1.1.3.1. Ácidos fenólicos

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos está relacionada com o número e posição dos grupos hidroxilo na molécula. Nos monofenóis, a introdução de um segundo grupo hidroxilo na posição *orto* ou *para*, assim como a presença de uma ou duas metoxilações na posição *orto* em relação ao grupo hidroxilo aumenta a sua eficácia antioxidante (216, 217): a substituição por grupos metoxilo ou alquilo, doadores de elétrons, na posição *orto*, permitem uma maior estabilização do radical fenoxilo resultante, devido a um deslocamento eletrónico após a doação do átomo de hidrogénio pelo grupo hidroxilo (216). Os derivados do ácido cinâmico exibem maior capacidade antioxidante que os respetivos ácidos benzoicos: a ligação dupla existente na cadeia lateral dos ácidos hidroxicinâmicos poderá exercer um efeito estabilizador do radical fenoxilo por ressonância, aumentando assim a atividade antioxidante do anel aromático (218) (Figura 22).

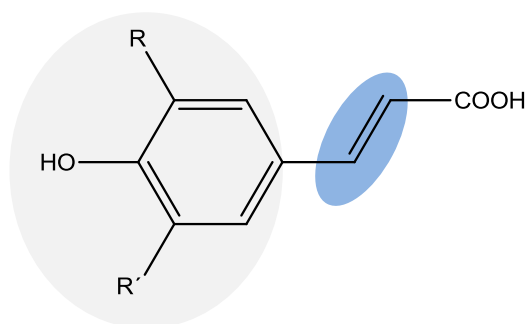


Figura 22. Relação estrutura – atividade antioxidante de ácidos hidroxicinâmicos [adaptada de (66)].

3.1.1.3.2. Flavonoides

As características estruturais mais importantes para a capacidade antioxidante dos flavonoides são a existência de uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 em conjugação com a função oxo no carbono 4 do anel C, a configuração dos grupos hidroxilo no anel B e a presença de um hidroxilo fenólico nos carbonos 5 e 3 em conjugação com o grupo carbonilo no carbono 4. O grupo catecol no anel B (substituição 3',4'-di-hidroxi) tem uma elevada capacidade de doar elétrons, tendo uma forte capacidade para captar radicais livres (Figura 23) (216).

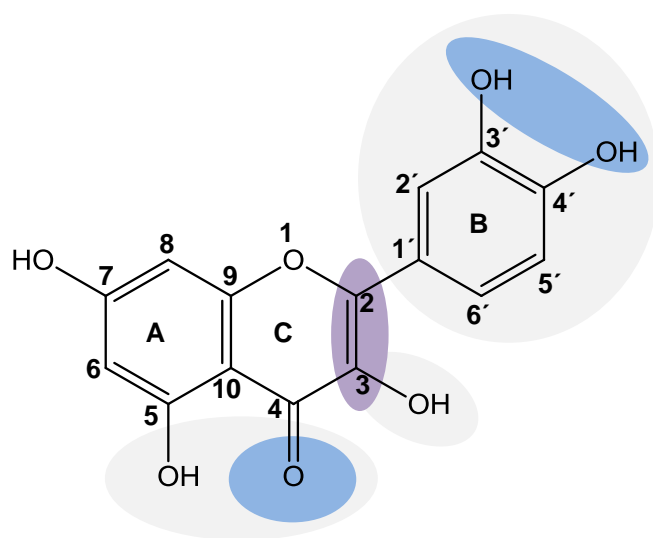


Figura 23. Relação estrutura – atividade antioxidante de flavonoides [adaptada de (215)].

A glicosilação e a metilação dos flavonoides reduzem a sua capacidade antioxidante, quando comparada com as respectivas aglícenas, devido à obstrução estérica, à diminuição da coplanaridade entre o anel B e a restante estrutura e ao aumento da hidrofília que influencia o acesso do antioxidante à fase lipídica (21, 71, 219). No entanto, o organismo tem capacidade de absorver quer os compostos livres, quer os ligados a açúcares (220). O primeiro passo do metabolismo dos heterósidos consiste na quebra da ligação glicosídica por β -glucosidases intestinais, libertando-se a aglícena. O flavonoide pode ser posteriormente degradado, originando diversos ácidos fenilcarboxílicos que, dependendo do seu padrão de substituição, poderão, apresentar atividade antioxidante (220).

3.1.1.3.3. Cumarinas

As cumarinas são também reconhecidas pela sua atividade antioxidante, nomeadamente pela sua capacidade para inibir a peroxidação lipídica e sequestrar os radicais hidroxilo e anião superóxido, ácido hipocloroso e o DPPH, assim como pela sua aptidão para inibir as enzimas 5-lipoxigenase e ciclooxigenase-1 (221-224). Esta atividade depende do padrão de substituição do anel fenólico; por exemplo, a ausência do grupo catecol e a perda da função di-hidroxilo, pela substituição de um grupo hidroxilo por um metoxilo ou por um açúcar, traduz-se numa menor atividade antioxidante (221-223, 225). De facto, a 5-metoxicumarina, sem hidroxilos fenólicos, é inativa enquanto a 6,7-di-hidroxi-cumarina possui elevada atividade antioxidante devido à presença do grupo

catecol (226). No entanto, são verificadas algumas exceções; por exemplo, a umbeliferona, não possui o anel aromático com *orto*-di-hidroxilação mas também apresenta ação antioxidante (227). Outras cumarinas, como a fraxetina e a 4-metil-dafnetina, são potentes inibidores da peroxidação lipídica e captadoras do radical superóxido (224).

Adicionalmente, as furanocumarinas lineares têm a capacidade de intercalar as cadeias duplas de DNA, estabelecendo ligações covalentes cruzadas, principalmente com os resíduos de timidina, provocando o bloqueio da transcrição e dos mecanismos de reparação do DNA levando à morte celular (94), e de inativar enzimas do citocromo P450 (228).

3.1.1.4. Fitosteróis

Os fitosteróis atuam como antioxidantes ao nível das membranas, inibindo a oxidação dos lípidos. Estes compostos são também descritos pela sua capacidade para sequestrar o radical DPPH (229). A atividade antioxidante destes compostos tem sido atribuída à formação de um radical alílico livre, que é seguidamente isomerizado dando origem a um radical terciário estável, o qual provoca uma interrupção na cascata oxidativa (230).

3.1.1.5. Ácidos gordos

Os ácidos gordos polinsaturados n-3 e n-6 são reconhecidos pela sua atividade antioxidante, especialmente pelo seu impacto positivo na atividade de algumas enzimas, como a CAT e SOD e, consequentemente, na diminuição da peroxidação lipídica (231, 232). De entre os diversos PUFA n-6, o ácido linoleico apresenta capacidade para sequestrar radicais livres (50), quelatar ferro e inibir a reação de Fenton (50). A atividade antioxidante dos PUFA n-3 é mais marcada do que a dos n-6, uma vez que os primeiros, para além de possuírem capacidade para sequestrar o radical óxido nítrico, reduzem significativamente os níveis de peróxidos lipídicos bem como a atividade da xantina oxidase (53, 54).

3.1.1.6. Compostos voláteis

Os compostos voláteis heterocíclicos obtidos de um açúcar ou aminoácido, tais como o furfural, tiazol e pirazina, atuam como antioxidantes pela inibição da oxidação dos lípidos. Esta atividade depende dos substituintes do anel heterocíclico, por exemplo, a introdução de um grupo alquilo traduz-se numa maior atividade antioxidante (233). Para além destes, o eugenol, linalol, β -pineno, limoneno e β -cariofileno são exemplos de alguns compostos voláteis para os quais também é atribuída esta atividade (233).

3.2. Inibição da acetilcolinesterase

A acetilcolina é um neurotransmissor a nível do sistema colinérgico, libertado para a fenda sináptica em resposta à estimulação nervosa, ligando-se a recetores pós-sinápticos. Esta molécula é inativada por clivagem, numa reação catalisada pela acetilcolinesterase (AChE), de que resultam uma molécula de colina e um grupo acetato (234). A perda gradual deste neurotransmissor está associada a deterioração cognitiva progressiva, bem como das funções neuromusculares e, conseqüentemente, à diminuição da autonomia (235). Vários estudos relevam que o principal mecanismo de ação dos fármacos usados no tratamento sintomático da Doença de Alzheimer (DA) consiste na inibição enzimática das colinesterases [AChE e butirilcolinesterase (BuChE)], provocando assim um aumento dos níveis cerebrais de acetilcolina na fenda sináptica (236, 237).

Nas últimas décadas, uma grande variedade de inibidores da AChE de origem vegetal têm revelado um enorme potencial para o tratamento da DA, melhorando a função cognitiva. Por exemplo, alcaloides (como a fisostigmina e galantamina), monoterpénos (como o acetato de bornilo, geraniol, limoneno, α -pineno) e cumarinas (como a escopoletina e marmesina) mostraram ser capazes de inibir a AChE, retardando assim a progressão da doença, sendo os alcaloides os compostos com maior atividade (234). Contudo, estes inibidores podem ser também utilizados no tratamento da doença senil, demência, ataxia, miastenia gravis e Parkinson (236).

3.3. Ensaios em sistemas celulares

Os ensaios realizados em sistemas químicos são normalmente ensaios rápidos, fáceis de realizar e constituem uma primeira abordagem à atividade antioxidante de extratos ou moléculas. Contudo, estes ensaios não refletem as condições fisiológicas, não tendo em conta a biodisponibilidade e o metabolismo dos compostos. Assim, os ensaios químicos deverão ser sempre complementados com estudos em sistemas celulares que permitam avaliar a citotoxicidade dos compostos presentes nas matrizes para confirmar a capacidade antioxidante observada *in vitro*. Para além de eliminar a necessidade de utilização de animais, são ensaios passíveis de automatização (238).

Neste tipo de ensaios recorre-se a diferentes linhas celulares, as quais facilitam a caracterização de subpopulações celulares e a compreensão de mecanismos a nível molecular. Adicionalmente, estes ensaios permitem realizar estudos num ambiente controlado sem a complexidade de interações entre numerosos tipos de células e fatores que ocorrem *in vivo*, realçando o efeito específico atribuído a um tipo celular ou estímulo (238).

Os efeitos protetores ou tóxicos dos extratos vegetais, ou de alguns dos seus componentes, dependem das concentrações de extrato utilizadas, da presença ou não de stress, bem como do tipo de stress que é induzido. Porém, os extratos ricos em compostos fenólicos e fitosteróis apresentam, de um modo geral, efeitos celulares protetores (137, 239-242).

De modo a avaliar o efeito dos extratos na proliferação, viabilidade e ativação celular, existem diversos parâmetros biológicos, tais como a integridade da membrana, atividade metabólica, atividade da cadeia respiratória, taxa de síntese proteica total, número de células baseado no DNA nuclear total e atividade lisossômica, que podem ser determinados (238).

Nesta dissertação de doutoramento foram utilizadas duas linhas celulares, as células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster) e SH-SY5Y (células neuronais obtidas de neuroblastoma humano). As células V79 constituem um modelo relevante para a avaliação do potencial antioxidante de extratos. Para além de apresentarem facilidade de crescimento e serem fáceis de trabalhar, são células que estão naturalmente expostas a agentes oxidantes, tendo já revelado capacidade de resposta ao stress oxidativo (243). Deste modo, este modelo celular tem sido usado por muitos autores para avaliar a proteção conferida por extratos de plantas a células sujeitas a stress oxidativo induzido,

por exemplo, pelo sistema xantina/xantina oxidase, *tert*-butil-hidroperóxido ou H_2O_2 (244).

As células SH-SY5Y são isoladas de um neuroblastoma e são consideradas como o modelo ideal para avaliar a capacidade de neuroproteção de extratos de plantas. Como se trata de uma linha celular cancerígena apresenta a vantagem de poder ser subcultivada e criopreservada. Apesar do seu baixo nível de diferenciação celular, estas células são bem caracterizadas, relativamente a enzimas e recetores (245).

4. OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO

1. Estudo fitoquímico (compostos fenólicos, ácidos orgânicos, compostos voláteis, ácidos gordos, aminoácidos e fitosteróis) de vários materiais de *F. carica* (folhas, cascas, polpas e látex);
2. Estudo da diversidade genética de cultivares portuguesas de *F. carica* e estabelecimento de possíveis relações entre marcadores morfológicos e moleculares e a composição em metabolitos secundários;
3. Avaliação da atividade antioxidante e citotoxicidade dos diversos materiais de *F. carica*;
4. Avaliação dos efeitos genotóxicos das folhas de *F. carica*;
5. Estabelecimento de possíveis relações entre a composição química e a atividade biológica dos diversos materiais de *F. carica*.

PARTE II
SECÇÃO EXPERIMENTAL

5.1. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening

Food Chem. Toxicol. 2009, 47, 2841-2846



Ficus carica L.: Metabolic and biological screening

Andreia P. Oliveira^a, Patrícia Valentão^a, José A. Pereira^b, Branca M. Silva^{a,c},
Fernando Tavares^{d,e}, Paula B. Andrade^{a,*}

^aREQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

^bCIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

^cCEBIMED/Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

^dIBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto, Portugal

^eFaculdade de Ciências da Universidade do Porto, Departamento de Botânica, Rua do Campo Alegre 1191, 4150-181 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2009

Accepted 3 September 2009

Keywords:

Ficus carica L.

Phenolic compounds

Organic acids

Antioxidant

Acetylcholinesterase inhibition

Antimicrobial activity

ABSTRACT

Ficus carica L. is one of the earliest cultivated fruit trees. In this work, metabolite profiling was performed on the leaves, pulps and peels of two Portuguese white varieties of *F. carica* (Pingo de Mel and Branca Tradicional). Phenolics and organic acids profiles were determined by HPLC/DAD and HPLC/UV, respectively. All samples presented a similar phenolic profile composed by 3-*O*- and 5-*O*-caffeoylquinic acids, ferulic acid, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-rutinoside, psoralen and bergapten. 3-*O*-Caffeoylquinic acid and quercetin-3-*O*-glucoside are described for the first time in this species. Leaves' organic acids profile presented oxalic, citric, malic, quinic, shikimic and fumaric acids, while in pulps and peels quinic acid was absent. The antioxidant potential of the different plant parts was checked. All materials exhibited activity against DPPH and nitric oxide radicals in a concentration-dependent way. However, only the leaves presented capacity to scavenge superoxide radical. Leaves were always the most effective part, which seems to be related with phenolics compounds. Additionally, acetylcholinesterase inhibitory capacity was evaluated, but no effect was observed. Antimicrobial potential was also assessed against several bacterial species, although no activity was noticed. This is the first study comparing the chemical composition and biological potential of *F. carica* pulps, peels and leaves.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ficus carica L., a deciduous tree belonging to the Moraceae family, is one of the earliest cultivated fruit trees. Mediterranean diets are characterized by abundant intake of this fruit (Solomon et al., 2006), which can be eaten fresh, dried or used as jam. Figs are an excellent source of minerals, vitamins and dietary fibre; they are fat and cholesterol-free and contain a high number of amino acids (Veberic et al., 2008; Solomon et al., 2006). Figs have been traditionally used for its medicinal benefits as laxative, cardiovascular, respiratory, antispasmodic and anti-inflammatory remedies (Guarrera, 2005).

Some studies have described the presence of several phenolic compounds in this species (Teixeira et al., 2006; Vaya and Mahmood, 2006; Guarrera, 2005), phytosterols and fatty acids in fruits and branches of fig trees (Jeong and Lachance, 2001) and its antioxidant activity (Solomon et al., 2006). However, leaf, pulp and peel's metabolic profile and biological activity have not been compared.

Biomolecules from plants have attracted a great deal of attention, mainly concentrated on their role in preventing diseases. Epidemiological studies have consistently shown that there is a clear significant positive association between intake of these natural products and reduced rate of heart disease mortalities, common cancers and other degenerative diseases. Free radicals present in human organism cause oxidative damage to various molecules, such as lipids, proteins and nucleic acids, being involved in the initiation of those diseases (García-Alonso et al., 2004). Antioxidant compounds, such as phenolics, organic acids, vitamin E and carotenoids, scavenge free radicals, thus inhibiting the oxidative mechanisms that lead to degenerative illnesses (du Toit et al., 2001; Silva et al., 2004). Additionally, growing interest has been devoted to natural antimicrobial agents, in order to avoid chemical preservatives and because of increasing antibiotics resistance.

Phenolic compounds are secondary metabolites that are quite widespread in nature. These compounds play many physiological roles in plants and some of them are also favourable to human health, since they are able to act as antioxidants by different ways: as reducing agents, hydrogen donors, free radicals scavengers, and singlet oxygen quenchers and, therefore, as cell saviours (Merken and Beecher, 2000; Costa et al., 2009; Fattouch et al., 2007).

* Corresponding author. Tel.: +351 222078934; fax: +351 222003977.

E-mail address: pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

Organic acids are primary metabolites, which can be found in great amounts in all plants, especially in fruits. These compounds also have antioxidant properties (Silva et al., 2004; Valentão et al., 2005a, 2005b). Citric, malic and tartaric acids are commonly found in fruits and berries, while oxalic acid is present in higher amounts in green leaves (Oliveira et al., 2008). Ascorbic acid is probably the most widely distributed water soluble antioxidant in vegetables (Naidu, 2003; Seabra et al., 2006; Sousa et al., 2009).

Recently, several studies have been developed to assess the ability of natural compounds inhibition of acetylcholinesterases, since it is directly related with the treatment of neurological disorders, such as Alzheimer's disease, senile dementia, ataxia and *myasthenia gravis* (Mukherjee et al., 2007). Acetylcholinesterase breaks down the ester bond in the molecule of acetylcholine, thus leading to the loss of stimulatory activity. Inhibition of acetylcholinesterases will, as far as nervous transmission is concerned, result in a prolongation of the existence, and therefore of the activity, of acetylcholine (Houghton et al., 2006).

The aim of the present work was to characterise the phenolics and organic acids composition of the material obtained from two Portuguese *F. carica* varieties (Pingo de Mel and Branca Tradicional), using HPLC coupled to diode array and UV detectors, respectively, and to assess their biological potential, namely as antioxidant, acetylcholinesterase inhibitor and antimicrobial agent. To our knowledge this is the first report comparing chemical composition and bioactivity of several materials from *F. carica*. In addition, no previous study involved the above mentioned varieties.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

Quercetin 3-O-rutinoside, bergapten, psoralen, oxalic, malic, fumaric, shikimic, quinic and citric acids, ferulic acid, dimethyl sulfoxide (DMSO) and carbachol were from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and 5-O-caffeoylquinic acid was from Extrasynthèse (Genay, France). Sodium nitroprussiate dihydrate was from Riedel-de Haën (St. Louis, MO). N-(1-Naphthyl)ethylene-diamine dihydrochloride, phosphoric acid and methanol were from Merck. Sulfanilamide, β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitroblue tetrazolium chloride (NBT), phenazine methosulfate (PMS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), acetylthiocholine iodide and acetylcholinesterase were obtained from Sigma–Aldrich. The water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). The Chromabond C18 SPE columns (70 mL/10,000 mg) were purchased from Macherey–Nagel (Düren, Germany).

2.2. Plant material

F. carica (var. Pingo de Mel and var. Branca Tradicional) leaves and fruits were collected in Mirandela region (Northeast Portugal), in August 2008. Fruit peel and pulp were separated. All materials were frozen and lyophilized. Voucher specimens were deposited at Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University.

2.3. Extracts preparation

Fig leaves, peels and pulps (2 g) were boiled for 15 min in 500 ml of water. The resulting extracts were filtered over a filtration funnel and then lyophilized in a Labconco Freezone 4.5 apparatus (Kansas City, MO, US). The lyophilized extracts were kept in a desiccator, in the dark, until analysis.

2.4. HPLC/DAD for phenolic compounds analysis

Each lyophilized extract was redissolved in water, filtered and 20 μ L were analysed on an analytical HPLC unit (Gilson), using a Spherisorb ODS2 (25.0 \times 0.46 cm; 5 μ m, particle size) column, according to a described procedure (Oliveira et al., 2007). The solvent system used was a gradient of water-formic acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5% methanol and installing a gradient to obtain 15% B at 3 min, 25% B at 13 min, 30% B at 25 min, 35% B at 35 min, 45% B at 39 min, 45% B at 42 min, 50% B at 44 min, 55% B at 47 min, 70% B at 50 min, 75% B at 56 min and 80% B at 60 min, at a solvent flow rate of 0.9 mL/min. Detection was achieved with a Gilson Diode Array Detector (DAD). Spectral data from all

peaks were accumulated in the range 200–400 nm, and chromatograms were recorded at 320 nm and 350 nm. The data were processed on an Unipoint® System software (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France).

The compounds in each extract were identified by comparing their retention times and UV–vis spectra in the 200–400 nm range with authentic standards and with the library of spectra previously compiled by the authors.

Phenolic compounds quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards. Phenolic acids and furanocoumarins were determined at 320 nm and flavonoids at 350 nm. 3-O-Caffeoylquinic acid was quantified as 5-O-caffeoylquinic acid and the other compounds were quantified as themselves.

2.5. HPLC/UV for organic acids analysis

Before HPLC analysis, each lyophilized extract was dissolved in acid water (pH 2 with HCl). The solution obtained was passed through an SPE C18 column, previously conditioned with 30 mL of methanol and 70 mL of acid water. The aqueous solution was then evaporated to dryness under reduced pressure (40 °C), redissolved in sulphuric acid 0.01 N (1 mL) and 20 μ L were analysed on an analytical HPLC unit (Gilson), using an ion exclusion column Nucleogel® Ion 300 OA (300 \times 7.7 mm), in conjunction with a column heating device at 30 °C. Elution was carried out at a solvent flow rate of 0.2 mL/min, isocratically, with sulphuric acid 0.01 N as the mobile phase. Detection was performed with a Gilson UV detector at 214 nm. Organic acids quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards.

2.6. Antioxidant activity

2.6.1. DPPH scavenging activity

The aqueous lyophilized extract of each sample was dissolved in water (five different concentrations). Antiradical activity was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo; electron corporation), by monitoring the disappearance of DPPH at 515 nm, according to a described procedure (Costa et al., 2009). The reaction mixtures in the sample wells consisted of extract and 150 μ M DPPH. The plate was incubated for 30 min at room temperature after the addition of DPPH. Three experiments were performed in triplicate.

2.6.2. Nitric oxide scavenging activity

The aqueous lyophilized extract of each sample was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The antiradical activity was determined in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo; electron corporation), according to a described procedure (Sousa et al., 2008). Sodium nitroprusside (20 mM) was incubated with each extract (five different concentrations) for 60 min, at room temperature, under light. All solutions were prepared in phosphate buffer. After incubation, Griess reagent, containing 1% sulphanilamide and 0.1% naphthylethyldiamine in 2% phosphoric acid, was added to each well. The mixture was incubated at room temperature for 10 min, and the absorbance of the chromophore formed during the diazotization of nitrite with sulphanilamide and subsequent coupling with naphthylethylenediamine was read at 562 nm. Three experiments were performed in triplicate.

2.6.3. Superoxide radical scavenging activity

The aqueous lyophilized extract of each sample was dissolved in 19 mM phosphate buffer (pH 7.4). Superoxide radicals were generated by NADH/PMS system according to a described procedure (Valentão et al., 2001). All components were dissolved in buffer. In each well, sample (five different concentrations), NADH, NBT and PMS were added. The absorbances were read at 560 nm. Three experiments were performed in triplicate.

2.7. Acetylcholinesterases inhibitory activity

2.7.1. Buffers

The following buffers were used. Buffer A: 50 mM Tris–HCl, pH 8; buffer B: 50 mM Tris–HCl, pH 8, containing 0.1% bovine serum albumin (BSA); buffer C: 50 mM Tris–HCl, pH 8, containing 0.1 M NaCl and 0.02 M MgCl₂·6H₂O.

2.7.2. Enzyme

Acetylcholinesterase was from *Electrophorus electricus* – electric eel – (type VI-s, lyophilized powder, 425 U/mg, 687 mg/protein). Lyophilized enzyme was dissolved in buffer A to make 1000 U/mL stock solution, and further diluted with buffer B to get 0.44 U/mL enzyme for the microplate assay.

2.7.3. Microplate assay

Acetylcholinesterase inhibitory activity was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo; electron corporation) based on Ellman's method, according to a described procedure (Pereira et al., 2009). In each well the mixture consisted of acetylthiocholine in water, DTNB in buffer C, buffer B and sample dissolved in a solution of 10% methanol in buffer A. The absorbance was read at 405 nm. After this step acetylcholinesterase was added and the

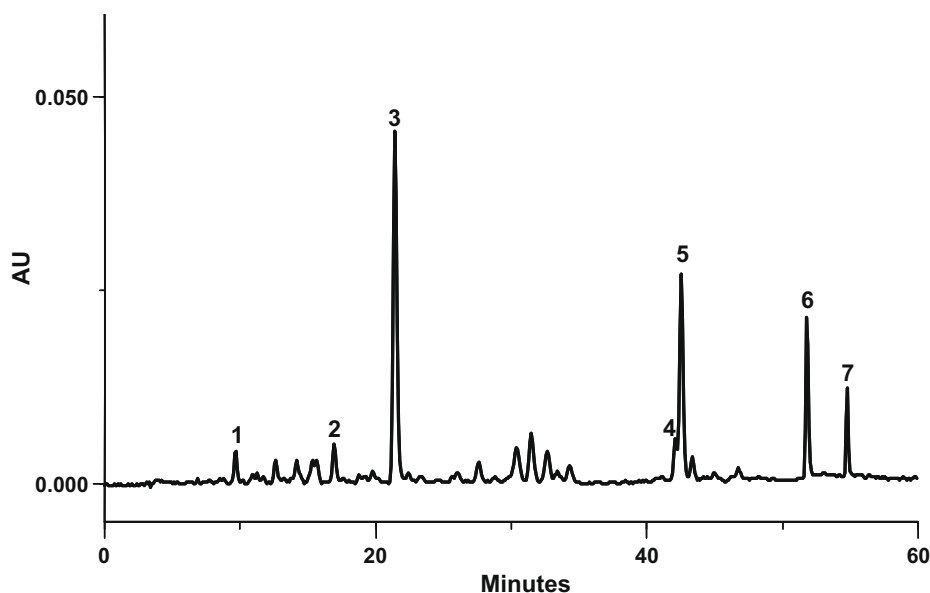


Fig. 1. HPLC phenolic profile of *Ficus carica* leaves. Detection at 320 nm. Peaks: (1) 3-*O*-caffeoylquinic acid; (2) 5-*O*-caffeoylquinic acid; (3) ferulic acid; (4) quercetin 3-*O*-glucoside; (5) quercetin 3-*O*-rutinoside; (6) psoralen; (7) bergapten.

Table 1

Phenolic composition of Portuguese *Ficus carica* L. varieties (mg/kg lyophilized extract).^a

Phenolics	Pingo de mel			Branca Tradicional		
	Peel	Pulp	Leaves	Peel	Pulp	Leaves
3-CQA	3.2 ± 0.9	nq	nq	nq	nq	nq
5-CQA	43.8 ± 3.8	32.9 ± 23.2	1158.8 ± 7.4	8.3 ± 0.5	2.8 ± 0.0	473.6 ± 9.5
Ferulic acid	20.5 ± 0.1	–	11983.8 ± 241.5	9.2 ± 0.0	–	nq
Q-3-Glu	31.4 ± 2.1	nq	1633.9 ± 11.1	30.8 ± 1.2	nq	611.1 ± 29.0
Q-3-Rut	499.1 ± 1.2	nq	14585.8 ± 1164.9	629.6 ± 18.3	64.6 ± 1.7	17440.4 ± 1709.6
Psoralen	2.6 ± 0.0	3.7 ± 0.5	3774.7 ± 237.7	18.4 ± 2.6	17.0 ± 0.2	9259.7 ± 29.3
Bergapten	nq	nq	1336.7 ± 78.7	26.8 ± 11.1	45.8 ± 11.2	4627.2 ± 361.7
Σ	600.6	36.6	34473.6	723.0	130.3	32412.0

^a Values are expressed as mean ± standard deviation of three assays; nq, not quantified; Σ, sum of the determined phenolic compounds; 3-CQA: 3-*O*-caffeoylquinic acid; 5-CQA: 5-*O*-caffeoylquinic acid; Q-3-Glu: quercetin 3-*O*-glucoside; Q-3-rut: quercetin 3-*O*-rutinoside.

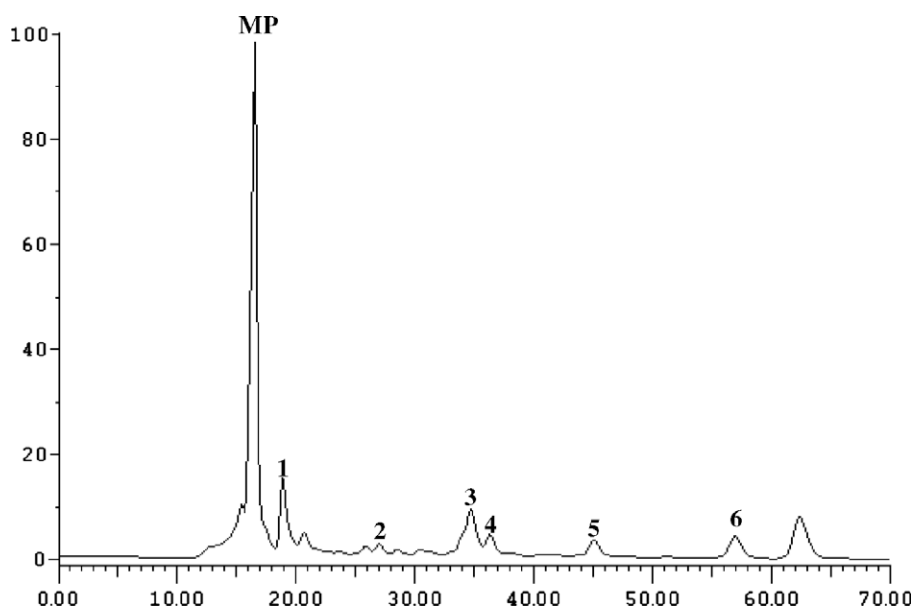


Fig. 2. HPLC organic acid profile of *Ficus carica* leaves. Detection at 214 nm. Peaks: (MP) mobile phase; (1) oxalic acid; (2) citric acid; (3) malic acid; (4) quinic acid; (5) shikimic acid; (6) fumaric acid.

absorbance was read again. The rates of reactions were calculated by Ascent Software version 2.6 (Thermo Labsystems Oy). The rate of the reaction before adding the enzyme was subtracted from that obtained after adding the enzyme in order to correct eventual spontaneous hydrolysis of substrate. Percentage of inhibition was calculated by comparing the rates of the sample with the control (10% methanol in buffer A). Three experiments were performed in triplicate.

2.8. Antimicrobial activity

F. carica aqueous lyophilized extracts were tested for antimicrobial activity by diffusion assay against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. Water and aqueous garlic extract (1:1) were used as negative and positive references standards, respectively. The antibacterial susceptibility tests were performed on Muller–Hinton Agar media plates which were inoculated by streaking over the surface of the media a suspension of bacterial cells containing 10^6 CFU/mL. All extracts were diluted with 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), being tested at concentrations of 1.5 mg/mL for leaves and 50 mg/mL for pulps and peels. About 10 μ L of all materials solutions were placed in contact with the inoculated agar surface. Finally, the inoculated plates were incubated at 25 and 37 °C for 24–48 h, before screening for inhibition zones.

2.9. Statistical analysis

The evaluation of statistical significance was determined by ANOVA, followed by Newman–Keuls test. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Phenolic compounds

In fig materials, three hydroxycinnamic acids (3-*O*- and 5-*O*-caffeoylquinic acids and ferulic acid), two flavonoid glycosides (quercetin 3-*O*-glucoside and quercetin 3-*O*-rutinoside) and two furanocoumarins (psoralen and bergapten) (Fig. 1 and Table 1) were characterized. With the exception of ferulic acid that was not found in pulps, all of the remaining phenolics were present in the three analysed matrices. As far as we know, 3-*O*-caffeoylquinic acid and quercetin 3-*O*-glucoside are described for the first time in this species.

In quantitative terms, aqueous lyophilized extracts of leaves presented the highest quantities of these compounds and pulps the lowest ones (Table 1). Indeed, the total phenolic content is significantly different among the three vegetal materials, following the order leaves \gg peels \gg pulps. This fact is not surprising since these compounds, especially flavonoids, act as UV filters, protecting some cell structures, like chloroplasts, from harmful effects of UV radiation (Treutter, 2006; Macheix et al., 1990). Among these compounds, flavonols, like quercetin derivatives, should be highlighted (Oliveira et al., 2007). For pulp and peel, Branca Tradicional was the variety with higher amounts of phenolic compounds, while the leaves of Pingo de Mel exhibited higher phenolics contents (Table 1).

In all samples, quercetin 3-*O*-rutinoside was the major compound, representing 42–87% of total identified phenolics, with the exception of Pingo de Mel pulp in which chlorogenic acid

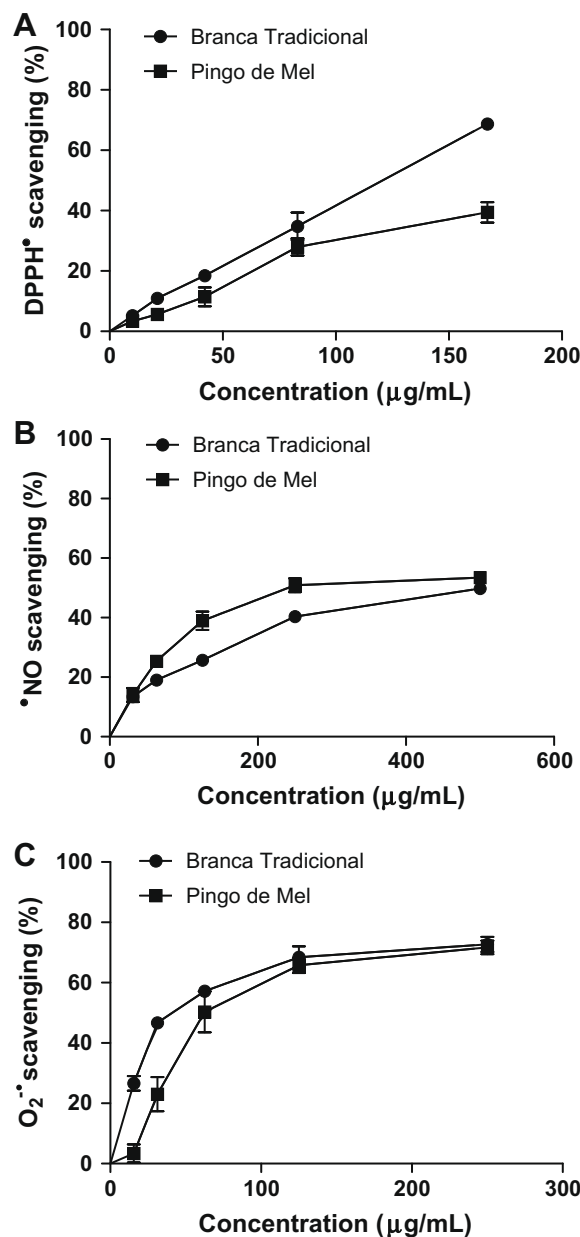


Fig. 3. Effects of *Ficus carica* leaves varieties Branca Tradicional and Pingo de Mel aqueous lyophilized extracts against: (A) DPPH, (B) nitric oxide and, (C) superoxide radical. Values show mean \pm SE from three experiments performed in triplicate.

was present at the highest amount (90%). Quercetin 3-*O*-rutinoside content in peels was significantly higher than that found in pulps and leaves. 3-*O*-Caffeoylquinic acid was a vestigial com-

Table 2

Organic acids of Portuguese *Ficus carica* L. varieties (mg/kg lyophilized extract).^a

Organic acids	Pingo de mel			Branca Tradicional		
	Peel	Pulp	Leaves	Peel	Pulp	Leaves
Oxalic	155.5 \pm 4.8	79.4 \pm 1.1	2406.1 \pm 16.3	nq	nq	983.4 \pm 58.8
Citric	nq	2280.3 \pm 80.5	nq	2002.5 \pm 216.9	2663.2 \pm 58.6	nq
Malic	8704.1 \pm 133.3	6851.2 \pm 109.9	24171.1 \pm 1106.5	3648.4 \pm 212.5	5442.9 \pm 224.2	7684.4 \pm 167.8
Quinic	–	–	10502.5 \pm 97.1	–	–	5183.3 \pm 116.5
Shikimic	142.2 \pm 2.3	80.7 \pm 0.1	99.1 \pm 0.5	158.1 \pm 8.7	136.0 \pm 5.2	nq
Fumaric	23.0 \pm 0.4	24.2 \pm 4.0	81.1 \pm 3.9	31.4 \pm 4.2	58.3 \pm 1.0	nq
Σ	9024.9	9315.8	37260.0	5840.4	8300.3	13851.1

^a Values are expressed as mean \pm standard deviation of three assays; nq, not quantified; Σ , sum of the determined organic acids.

pound in all samples, excepting in the peel of Pingo de Mel variety (Table 1).

Psoralen occurred in pulps at significantly higher levels when compared with peels. Psoralen and bergapten (5-methoxypsoralen) are two photoactive furanocoumarins already reported in *F. carica* leaves (Teixeira et al., 2006). These compounds, especially psoralen, are utilized in association with UV radiation in the treatment of skin conditions, such as skin depigmentation (psoriasis and vitiligo), mycosis fungoides, polymorphous dermatitis, and eczema (Baumgart et al., 2005; Kulkosky and Diawara, 2003).

3.2. Organic acids

Organic acids profile of fig leaves is composed by six organic acids: oxalic, citric, malic, quinic, shikimic and fumaric acids (Fig. 2). In pulps and peels quinic acid was absent (Table 2). As far as we know, quinic and shikimic acids are reported for the first time in *F. carica*. The other compounds were already reported in fig juice (Shiraishi et al., 1996).

As it happened for phenolics, leaves are characterized by higher quantities of organic acids than the other materials. Peels exhibited the lowest contents (Table 2). This may be explained by the fact that leaves protect fruits from UV radiation and they have an important role in the photosynthesis process: they are able to convert light energy in chemical energy (glucose and ATP) by scavenging CO_2 and producing O_2 . After this, glucose can be used in the synthesis of various metabolites, including organic acids, amino acids, polysaccharides, phenolic compounds, among others, according to plant needs (Oliveira et al., 2008).

Malic acid was the main compound in all matrices, representing 56–96% of the total organic acids content. In pulps and peels it was

followed by citric acid (24–34%), excepting Pingo de Mel peel, in which it was present in vestigial amounts (Table 2). Quinic acid was detected only in leaves samples, being the second organic acid (28–37%). Thus, this compound may be useful as chemical marker for fig leaves. Oxalic, shikimic and fumaric acids were present in lower quantities.

Pingo de Mel was the variety with higher organic acids contents (Table 2).

3.3. Antioxidant activity

Pulps, peels and leaves extracts exhibited DPPH scavenging capacity, in a concentration-dependent way (Figs. 3A, 4A and 5A), being the leaves the most effective material (Table 3). The different samples also revealed to have nitric oxide scavenging ability, being the effect concentration-dependent (Figs. 3B, 4B and 5B). As it happened for DPPH, leaves showed the strongest capacity (Table 3). In what concerns to superoxide anion, leaves were the only material displaying a protective effect (Fig. 3C).

Overall, the results obtained in the three assays revealed that leaves possess the strongest antioxidant potential and pulps the weakest one (Table 3). These facts may be partially explained by the highest amounts of phenolic compounds occurring in leaves. In a general way, Branca Tradicional was the variety with stronger ability to scavenge free radicals (Table 3), which can be related with the highest flavonoids relative content comparing with the leaves of Pingo de Mel variety. The antioxidant capacity of phenolic compounds is based on their ability to scavenge free radicals, chelate pro-oxidant metal-ions and to inhibit some enzymes (Silva et al., 2004; Halliwell et al., 2000). Nevertheless, the contribution of organic acids cannot be ignored.

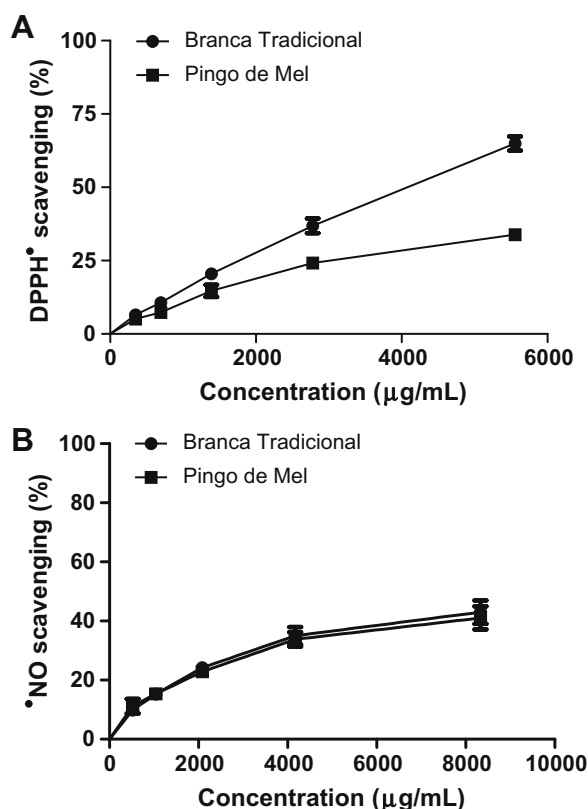


Fig. 4. Effects of *Ficus carica* peel varieties Branca Tradicional and Pingo de Mel aqueous lyophilized extracts against: (A) DPPH and, (B) nitric oxide. Values show mean \pm SE from three experiments performed in triplicate.

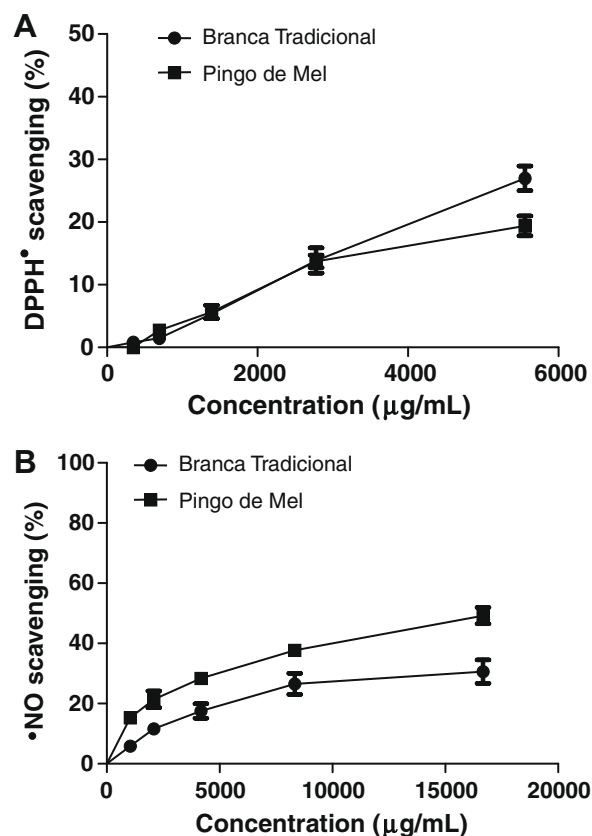


Fig. 5. Effects of *Ficus carica* pulp varieties Branca Tradicional and Pingo de Mel aqueous lyophilized extracts against: (A) DPPH and, (B) nitric oxide. Values show mean \pm SE from three experiments performed in triplicate.

Table 3IC₂₅ values obtained in antioxidant activity assays (μg/mL).

	Pingo de Mel			Branca Tradicional		
	Peel	Pulp	Leaves	Peel	Pulp	Leaves
DPPH [•]	2948.7	>5556	75.2	1724.3	4056.4	59.6
•NO	2425.5	3154.8	63.2	2195.7	7623.2	118.5
O ₂ ⁻	–	–	33.0	–	–	<15.6

3.4. Acetylcholinesterase inhibitory activity

The acetylcholinesterase inhibitory activity is, usually, the first of a number of requirements for the development of medicines for treating some neurological disorders, such as Alzheimer's disease (Pereira et al., 2009). These compounds are recently used in ophthalmology for the treatment of glaucoma and for the treatment of myasthenia gravis (Houghton et al., 2006).

According to Houghton et al. (2006), compounds like alkaloids, flavonoids, terpenoids, furano- and isocoumarins have the capacity to inhibit this enzyme. Although, our samples presented high quantities of flavonoids, namely quercetin 3-*O*-rutinoside, and furanocoumarins (psoralen and bergapten), they had no effect on acetylcholinesterase, in the tested concentrations. May be the lack of acetylcholinesterase inhibition might be related with the chemical structure of the identified compounds (Brühlmann et al., 2004). In addition, also the interactions between phenolics and other compounds present in the tested aqueous extract, namely antagonisms, may result in the absence of activity. Carbachol, tested as positive control under the same conditions, exhibited a IC₅₀ of 81 μg/mL.

3.5. Antimicrobial activity

None of the aqueous lyophilized extracts of *F. carica* materials produced an inhibition zone against the assayed bacterial species; therefore, no antimicrobial activity was found.

4. Conclusion

This is the first study comparing *F. carica* leaves, pulps and peels. Data obtained indicate that chemical composition and bioactivity are dependent on the variety. 3-*O*-Caffeoylquinic acid and quercetin 3-*O*-glucoside were described for the first time, which adds to the knowledge of this species. Leaves may constitute an excellent dietary and economical source of bioactive compounds, namely, phenolics. The consumption of this fruit may contribute to the prevention of diseases in which homeostasis is impaired by oxidative features. In addition, as leaves are characterized by higher quantities of psoralen and bergapten their use by cosmetic and pharmaceutical industries for the treatment of some dermatologic diseases, such as psoriasis and vitiligo, may deserve to be explored.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

Andreia P. Oliveira (SFRH/BD/47620/2008) is indebted to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for the grant.

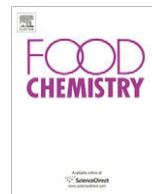
References

Baumgart, A., Schmidt, M., Schmitz, H.J., Schrenk, D., 2005. Natural furocoumarins as inducers and inhibitors of cytochrome P450 1A1 in rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 69, 657–667.

- Brühlmann, C., Marston, A., Hostettmann, K., Carrupt, P.-A., Testa, B., 2004. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. *Chem. Biodivers.* 1, 819–829.
- Costa, R.M., Magalhães, A.S., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Carvalho, M., Silva, B.M., 2009. Evaluation of free radical-scavenging and antihemolytic activities of quince (*Cydonia oblonga*) leaf: a comparative study with green tea (*Cammelia sinensis*). *Food Chem.* 47, 860–865.
- du Toit, R., Volsteed, Y., Apostolides, Z., 2001. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 166, 63–69.
- Fattouch, S., Caboni, P., Coroneo, V., Tuberoso, C.I.G., Angioni, A., Dessi, S., Marzouki, N., Cabras, P., 2007. Antimicrobial activity of tunisian quince (*Cydonia oblonga* Miller) pulp and peel polyphenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.* 55, 963–969.
- García-Alonso, M., Pascual-Teresa, S., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J.C., 2004. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* 84, 13–18.
- Guarrera, P.M., 2005. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* 76, 1–25.
- Halliwell, B., Clement, M.V., Long, H., 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 486, 10–13.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Nat. Prod. Rep.* 23, 181–199.
- Kulkosky, P.J., Diawara, M.M., 2003. Reproductive toxicity of the psoralens. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* 22, 247–258.
- Jeong, W.S., Lachance, P.A., 2001. Phytosterols and fatty acids in Fig (*Ficus carica*, var. Mission) fruit and tree components. *J. Food Sci.* 66, 278–281.
- Macheix, J.-J., Fleuriot, A., Billot, J., 1990. Fruit Phenolics. Boca Raton, CRC Press, Inc.
- Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* 48, 577–599.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P.J., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 14, 289–300.
- Naidu, K.A., 2003. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2, 7–16.
- Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M., 2007. Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7926–7930.
- Oliveira, A.P., Pereira, J.A., Andrade, P.B., Valentão, P., Seabra, R.M., Silva, B.M., 2008. Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chem.* 111, 393–399.
- Pereira, D.M., Ferreres, F., Oliveira, J., Valentão, P., Andrade, P.B., Sottomayor, M., 2009. Targeted metabolite analysis of *Catharanthus roseus* and its biological potential. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1349–1354.
- Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Bastos, M.L., 2006. Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. In: Biomaterials from Aquatic and Terrestrial Organisms. Science Publishers – Enfield (NH) Jersey Plymouth, New Hampshire.
- Shiraishi, S.-C., Kawakami, K., Widodo, S.E., Shiraishi, M., Kitazaki, M., 1996. Organic acid profile in the juice of fig fruits. *J. Fac. Agric., Kyushu Univ.* 41, 29–33.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel and seed) and jam: antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4705–4712.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., Altman, A., Kerem, Z., Flaishman, M.A., 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54, 7717–7723.
- Sousa, C., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2008. Tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC): scavenger of reactive nitrogen species. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4205–4211.
- Sousa, C., Pereira, D.M., Taveira, M., Dopico-Garcia, S., Valentão, P., Pereira, J.A., Bento, A., Andrade, P.B., 2009. *Brassica oleracea* var. *Costata*: comparative study on organic acids and biomass production with other cabbage varieties. *J. Sci. Food Agric.* 89, 1083–1089.
- Teixeira, D.M., Patão, R.F., Coelho, A.V., Costa, C.T., 2006. Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *J. Chromatogr. A* 1103, 22–28.
- Treutter, D., 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* 4, 147–157.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Bastos, M.L., 2001. Antioxidant activity of *Centaurium erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3476–3479.
- Valentão, P., Andrade, P.B., Rangel, J., Ribeiro, B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M., 2005a. Effect of the conservation procedure on the contents of phenolic compounds and organic acids in chanterelle (*Cantharellus cibarius*) mushroom. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4925–4931.
- Valentão, P., Lopes, G., Valente, M., Barbosa, P., Andrade, P.B., Silva, B.M., Baptista, P., Seabra, R.M., 2005b. Quantification of nine organic acids in wild mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 53, 3626–3630.
- Vaya, J., Mahmood, S., 2006. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *BioFactors* 28, 1–7.
- Veberic, R., Colaric, M., Stampar, F., 2008. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit *Ficus carica* in the northern Mediterranean region. *Food Chem.* 106, 153–157.

5.2. Determination of low molecular weight volatiles in *Ficus carica* using HS-SPME and GC/FID

Food Chem. 2010, 121, 1289-1295



Analytical Methods

Determination of low molecular weight volatiles in *Ficus carica* using HS-SPME and GC/FID

Andreia P. Oliveira^a, Luís R. Silva^a, Paula B. Andrade^{a,*}, Patrícia Valentão^a, Branca M. Silva^{a,b}, José A. Pereira^c, Paula Guedes de Pinho^{d,*}

^aREQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

^bCEBIMED/Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

^cCIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

^dREQUIMTE/Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2009

Received in revised form 7 December 2009

Accepted 27 January 2010

Keywords:

Ficus carica

Volatile compounds

HS-SPME

GC/FID

ABSTRACT

Ficus carica L. is one of the earliest cultivated fruit trees, having an important consumption in Mediterranean countries. In this work, the volatile compound profiles of two characteristic Portuguese white varieties ("Pingo de Mel" and "Branca Tradicional") was determined by HS-SPME and GC/FID. Leaves, pulps and peels, submitted to freezing and lyophilisation treatments, were analysed.

The two varieties presented a similar profile composed of eight volatile compounds: acetaldehyde, ethyl acetate, methanol, ethanol, hexanal, limonene, (*E*)-2-hexenal and octanal. The total volatile content was different among the vegetal materials, following the order leaves > peels > pulps. Methanol and ethanol are the major compounds in all samples.

The developed procedure revealed to be rapid, sensitive, reproducible and accurate. The detection limit values were low, and the method precise. The recovery values for acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and ethanol were generally high, suggesting that it will be most suitable for compounds with low molecular weight. Due to its rapidity and low cost, this technique can be useful in the quality control of fig fruit and leaves.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fig (*Ficus carica* L.) is a tree belonging to the Moraceae family, one of the first plants cultivated by humans as a seasonal food. It is an important constituent of the Mediterranean diet (Solomon et al., 2006). Previous studies with the fruits indicated that they are a source of minerals, vitamins and dietary fibre; they are fat and cholesterol-free and contain a high number of amino acids (Solomon et al., 2006; Vinson, Zubik, Bose, Samman, & Proch, 2005). Figs. also present sugars and organic acids that influence their quality, and exhibit one of the highest concentrations of polyphenols among the commonly consumed fruits and beverages, which contribute positively to human health (Veberic, Colaric, & Stampar, 2008; Vinson et al., 2005; Oliveira et al., 2009).

The formation of volatile compounds in fruits is a dynamic process, and generally the typical flavour of most of them is not present at harvest but develops after the ripening process. Volatile

compounds present in fresh and processed fruits significantly affect their flavour and aroma quality, which is formed by a complex group of chemical substances (Riu-Aumatell, Castellari, López-Tamames, Galassi, & Buxaderas, 2004). The variability in aroma compounds has been reported to depend on climatological conditions, cultivar, maturity and technological factors, like harvest, post-harvest treatments, processing and storage conditions (Douillard & Guichard, 1990; Rizzolo, Polesello, & Polesello, 1992; Botondi, De Santis, Bellicontro, Vizovitis, & Mencarelli, 2003; Lin, Rouseff, Barros, & Naim, 2002).

Gas chromatography (GC) methodologies have been described for the analysis of the volatile fraction of several matrices, using different techniques (Portari, Marchini, & Jordão, 2008; Ferrari, Arado, Nardo, & Giannuzzi, 2003). The determination of volatile compounds use headspace (HS) sampling coupled to GC as the preferred technique (Portari et al., 2008). The direct sample injection in packed columns (Ferrari et al., 2003) became obsolete and was gradually substituted by headspace techniques in capillary columns (Wasfi, Al-Awadhi, Al-Hatali, Al-Rayami, & Al-Katheeri, 2004) and, more recently, by the selective headspace injection using solid-phase microextraction (SPME) fibres (Riu-Aumatell et al., 2004; Dong, Mei, & Chen, 2006).

* Corresponding authors. Address: REQUIMTE/ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University. R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal. Tel.: +351 222078934; fax: +351 222003977 (P.B. Andrade).

E-mail addresses: pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade), pguedes@ff.up.pt (P. Guedes de Pinho).

SPME involves the adsorption of analytes onto a fused silica fibre, coated with a suitable stationary phase, and their subsequent desorption immediately before chromatographic analysis (Pawliszyn, 2000). The target analytes can be adsorbed on the fibre by immersing it in the sample or by exposing it to the sample headspace, in which case matrix interferences can be drastically reduced (Riu-Aumatell et al., 2004). Methods using SPME technique save preparation time, solvent purchase and disposal costs and can improve the detection limits (Dong et al., 2006). Actually, the SPME technique has been successfully applied to the analysis of volatile and semi-volatile organic compounds from environmental, biological and food samples (Barroso et al., 2005; Guedes de Pinho et al., 2008, 2009), namely fruits (Ibañez, Lopez-Sebastian, Ramos, Tabera, & Reglero, 1998).

Some works have reported the presence of volatile compounds in *F. carica* (Gibernau, Buser, Frey, & Hossaert-McKey, 1997; Grison, Edwards, & Hossaert-McKey, 1999; Grison-Pigé, Hossaert-McKey, Greeff, & Bessière, 2002; Buttery, Flath, Mon, & Ling, 1986). However, to our knowledge there is no report comparing the volatile composition of several materials from *F. carica*. In addition, no previous study involved two characteristic Portuguese white varieties: “Pingo de Mel” and “Branca Tradicional”.

This study was designed to determine low molecular weight volatiles in leaf, peel and pulp of the two above mentioned *F. carica* varieties, subjected to different treatments (frozen and lyophilised), by HS-SPME coupled to GC/FID.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

All chemicals used were of analytical grade: acetaldehyde, ethyl acetate and limonene (Fluka, Milwaukee, WI), methanol and acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), ethanol (Panreac, Barcelona, Spain), hexanal and octanal (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany), (*E*)-2-hexenal, 1-propanol, 1-butanol and 3-methyl-1-butanol (SAFC, St. Louis, USA).

Stock standard solutions of the analytes (10 g/l) were prepared in water, as well as a stock solution of the internal standard (IS) acetonitrile (1 g/100 ml).

2.2. Plant material

Ficus carica (“Pingo de Mel” and “Branca Tradicional” varieties) leaves and fruits were collected from the Mirandela region (North-east Portugal), in September 2008. Peel and pulp were separated. All materials were frozen (−20 °C) and an aliquot was subsequently lyophilised. Frozen and lyophilised samples were analysed separately. Voucher specimens were deposited at the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University.

2.3. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) procedure

2.3.1. SPME fibres

HS-SPME experiments were performed using a manual fibre holder and a 65 µm PDMS-DVB fibre, obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Fibre was conditioned by inserting it into the GC injector; temperature and time were applied according to the procedure recommendation of Supelco: 250 °C for 30 min.

2.3.2. Volatiles extraction

One gram of sample was mixed with 20 µl of IS solution and 4980 µl of distilled water. The mixtures were stirred at 200 rpm, at 40 °C for 10 min.

The fibre was then exposed to the headspace for 20 min, with agitation (200 rpm), at 40 °C. After it was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption. After 1 min the fibre was removed and conditioned in another GC injection port (10 min at 250 °C).

2.4. Gas chromatography with flame ionisation detection (GC/FID) analysis

The GC used was a Focus GC ThermoFinnigan Model, with a FID. The injection port of the chromatographer was equipped with a glass liner (5-mm i.d.) appropriate for SPME analysis.

The analysis were performed with a CPWax 57 CB (WCOT Fused Silica), 25 m × 0.25 mm i.d., DF = 0.2 µm column, from Varian (Palo Alto, CA). The temperature of the FID and of the injector was 220 °C. The oven temperature was programmed at 38 °C (for 3 min), followed by an increase of 5 °C/min until 195 °C. The carrier gas was helium, at a flow of 1.5 ml/min. The analysis was performed in split mode with a ratio of 1:7.

Compounds were identified by comparing their retention times with those of authentic compounds analysed under the same conditions, and by comparison of the retention indices (as Kovats indices) with literature data.

3. Results and discussion

3.1. HS-SPME volatiles extraction

HS-SPME methodologies require an accurate time, controlled sample heating, and adequate sample weight to obtain a good partitioning of the volatile compounds between liquid and headspace vapour. Thus, a preliminary assay with an aqueous solution of frozen sample was performed, using different conditions.

3.1.1. Effect of extraction temperature

A PDMS-DVB fibre was used to establish the experimental conditions for HS-SPME analysis of *F. carica* volatile compounds. In this experiment the temperature ranged from 30 to 60 °C, for 30 min. Although, in a general way, areas obtained were higher for 30 °C, in this work the volatile compounds were extracted at 40 °C, once this temperature is slightly superior to that of the human palate (~35 °C), where mastication occurs (Beaulieu & Grimm, 2001), constituting a better approach to the situation of ingestion of these matrices. On the other hand, it is easier to maintain constant and homogeneous higher temperatures such as 40 °C than lower ones like 30 °C.

3.1.2. Effect of sample weight

Experiments were performed using distinct sample weights, from 0.5 to 1.5 g. The sample volume was 5 ml. In Fig. 1, we can observe that a higher sample amount did not always result in increased extraction of compounds. In fact, during the laboratory experiment, we had some difficulties in the homogenisation of some samples, namely pulps and peels, when we used a mass of 1.5 g and for this reason we have chosen to work with 1.0 g of each material to homogenise the sample.

3.1.3. Effect of fibre exposure duration

Equilibrium times between 5 min and 1 h before SPME analysis have usually been reported (Pérez, Sánchez-Brunete, Calvo, & Tadeo, 2002). In this work, the effect of exposure time on extraction efficiency was evaluated by sampling in headspace after 10, 20, 30, 40 and 50 min. As the extraction time may be influenced by both temperature and stirring speed (Dong et al., 2006), equilibrium

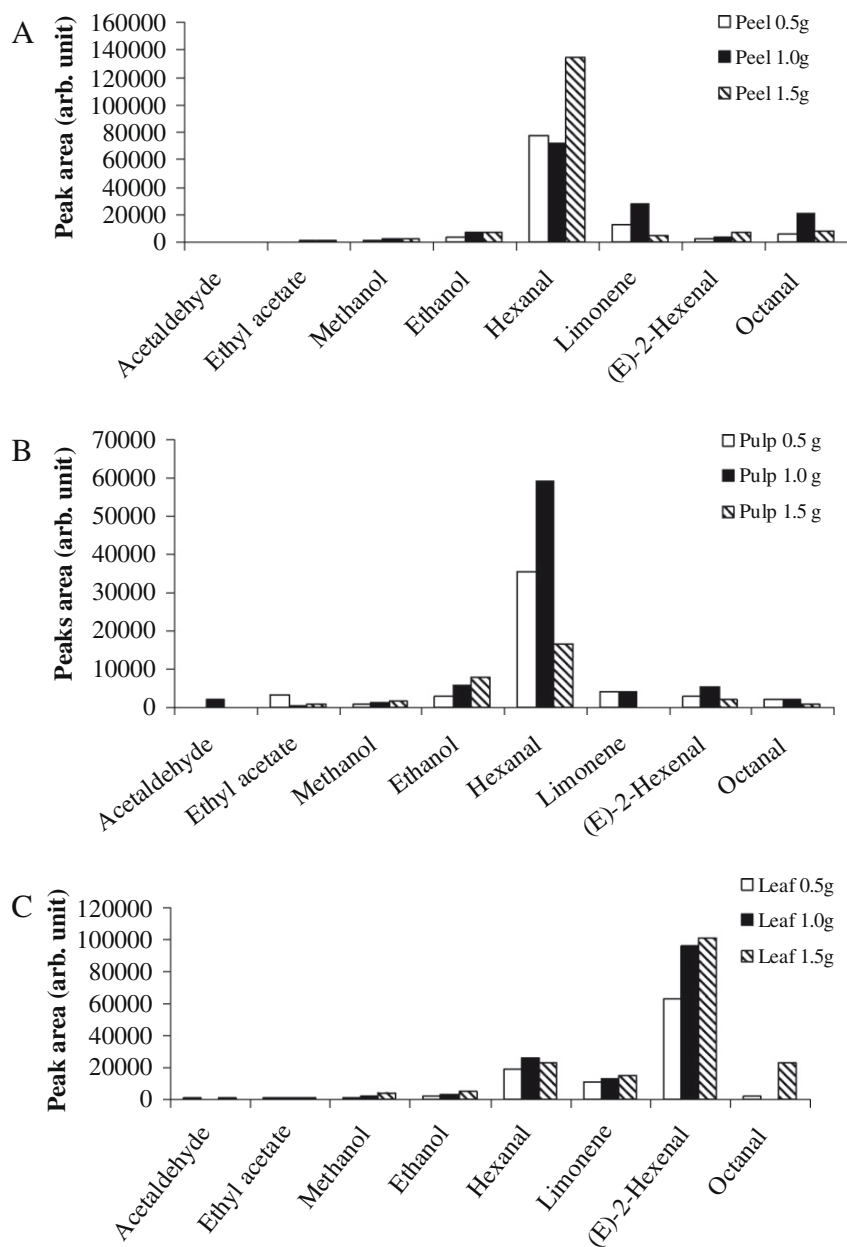


Fig. 1. Effect of sample weight on the peak areas of the main volatile compounds of *F. carica* ("Pingo de Mel"). (A) Peel, (B) pulp and (C) leaf.

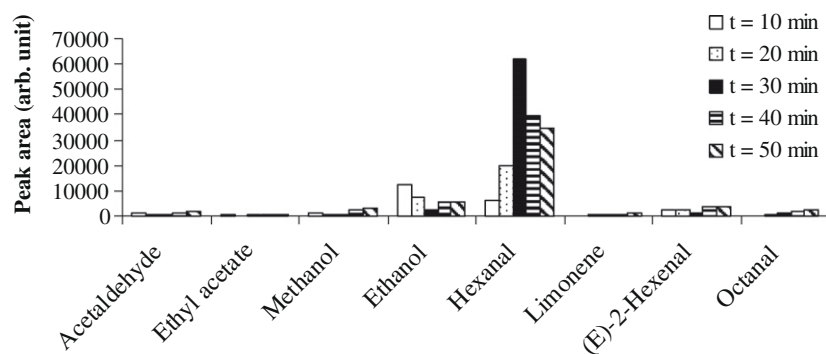


Fig. 2. Effect of extraction time on the peak areas of the main volatile compounds of *F. carica* ("Pingo de Mel").

time was determined by maintaining the temperature at 40 °C and the stirring speed at 200 rpm. The effect of the duration of the

exposure to fibre is presented in Fig. 2. A 10 min exposition period was not enough to extract all compounds: for example, limonene

Table 1

Retention times, linearity, detection and quantification limits for volatile compounds.

Volatile compounds	RI ^a	Regression equation	Linear range (mg/l)	R ²	Detection limit LOD (µg/l)	Quantification limit LOQ (µg/l)
Acetaldehyde	590	$y = 0.0298x - 0.289$	1–500	0.9940	17.8	59.5
Ethyl acetate	724	$y = 0.353x - 0.963$	1–200	0.9920	1.5	5.0
Methanol	768	$y = 0.0032x + 0.0085$	1–500	0.9962	166.2	554.1
Ethanol	810	$y = 0.019x + 0.097$	0.01–100	0.9960	28.0	93.3
Hexanal	957	$y = 22.94x + 1.547$	0.01–100	0.9980	0.023	0.077
Limonene	1096	$y = 13.15x - 0.630$	0.01–100	0.9920	0.040	0.134
(E)-2-Hexenal	1130	$y = 23.85x + 0.641$	0.01–100	0.9980	0.022	0.074
Octanal	1213	$y = 71.55x - 0.264$	0.01–100	0.9940	0.007	0.024

^a Retention indices as determined on a CPWAX57CB capillary column using the homologous series of *n*-alkanes; SD, standard deviation.**Table 2**Evaluation of the analytical method precision (*n* = 5) ("Pingo de Mel" pulp).

Volatile compounds	Intra-day		Inter-Day	
	SD (mg/kg)	CV (%)	SD (mg/kg)	CV (%)
Acetaldehyde	1.90	2.67	3.64	5.27
Ethyl acetate	0.26	1.98	0.58	4.40
Methanol	41.7	5.99	34.4	7.90
Ethanol	6.74	4.23	21.7	14.8
Hexanal	0.05	5.62	0.14	13.4
Limonene	0.02	4.59	0.03	10.7
(E)-2-Hexenal	0.01	9.81	0.001	10.4
Octanal	0.001	3.39	0.003	12.8

SD, standard deviation; CV, coefficient of variation.

Table 3

Recoveries of volatile compounds from peel, pulp and leaf sample ("Pingo de Mel" variety) (%).

Volatile compounds	Frozen			Lyophilised		
	Peel	Pulp	Leaf	Peel	Pulp	Leaf
Acetaldehyde	74.0	96.5	96.7	77.0	90.7	87.6
Ethyl acetate	108.1	92.6	111.6	87.8	78.2	73.0
Methanol	102.9	79.44	76.5	93.8	100.4	104.2
Ethanol	75.1	76.50	75.8	32.6	85.8	52.3
Hexanal	21.3	56.20	64.1	23.0	32.6	7.85
Limonene	74.1	84.6	91.7	8.22	83.4	61.9
(E)-2-Hexenal	26.3	32.5	44.6	15.9	16.7	23.7
Octanal	26.1	24.9	22.4	1.68	5.53	3.19

and octanal were not detected. With the 20 min of fibre exposure we obtained the same volatile qualitative composition as with 30, 40 and 50 min, although in quantitative terms the results obtained with all compounds were distinct. We have chosen to use 20 min of exposure, because it allowed finding the same compounds in a shorter time. As all samples were treated in the same way, the results can be compared.

3.2. GC/FID analysis

3.2.1. Validation of the method

The method developed for the determination of volatile compounds in fig fruits and leaves was validated according to the standard procedures (Food and Drug Administration, 2001).

3.2.1.1. Linearity. Dilution series were prepared for each analyte, which were analysed by GC/FID. The calibration curves were obtained by triplicate determinations of each calibration standard, and the peak area values (arbitrary units) were plotted as average values. Under the described assay conditions, a linear relationship between the concentration of volatile compounds and the FID response was obtained. The correlation coefficient for the standard curves invariably exceeded 0.99 for all compounds (Table 1). Thus, the HS-SPME procedure showed a good linear correlation.

3.2.1.2. Limits of detection and quantification. The limits of detection (LOD) were calculated as the concentration corresponding to three times the standard deviation of the background noise, and the values obtained ranged from 0.007 to 166.2 µg/l (Table 1). The limit of quantification (LOQ) is defined as the concentration that originated, for each analyte, a signal equal to ten times of the background noise. The values obtained for LOQ are displayed in Table 1 and varied between 0.024 and 554.1 µg/l.

3.2.1.3. Evaluation of specificity. To evaluate specificity, we have checked the presence of interferents: interferents were ruled out by verifying the absence of peaks in the retention time of the studied analytes. For the evaluation of this parameter, one sample and the internal standard were injected separately. The IS retention time was 3.71 min. No co-elution was observed for the determined compounds. The data obtained demonstrates that acetonitrile (IS) was well separated from the other analytes.

3.2.1.4. Precision and accuracy. Intra-day precision of the analytical method was evaluated by measuring the peak chromatographic area of volatile compounds in five determinations of the same pulp sample, performed in the same day. The analytical method is precise, once the coefficients of variation of volatile compounds for intra-day precision were lower than 20% (Table 2).

The inter-day precision of the method was determined by analysing, for five distinct days, fig pulp samples daily extracted. The coefficients of variation obtained were always lower than 15%, and the method presented a good inter-day precision.

To study the recovery of the procedure the sample was added to known quantities of acetaldehyde, ethyl acetate, methanol, ethanol, hexanal, limonene, (E)-2-hexenal and octanal. The samples were analysed in triplicate before and after the additions. Generally, the recovery values were high for the volatiles with low molecular weight, such as acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and ethanol (Table 3), which demonstrates a good accuracy of the method for these compounds.

3.2.2. Qualitative analysis

Under the optimised conditions, eight volatile compounds were determined in frozen and lyophilised leaves and fruits (peel and pulp) of *F. carica*: acetaldehyde, ethyl acetate, methanol, ethanol, hexanal, limonene, (E)-2-hexenal and octanal (Fig. 3). Other alcohols, namely 1-propanol, 1-butanol and 3-methyl-1-butanol, could also be determined by this method, but they were not detected in the analysed samples. As far as we know, acetaldehyde, methanol and ethanol are reported for the first time in *F. carica*.

3.2.3. Quantification of volatile compounds

The volatile compounds of frozen and lyophilised fig fruits (peel and pulp) and leaves were analysed by the proposed technique (Fig. 4 and Table 4).

Comparing the results obtained for the fruits (peel and pulp) and leaves samples of "Pingo de Mel" and "Branca Tradicional"

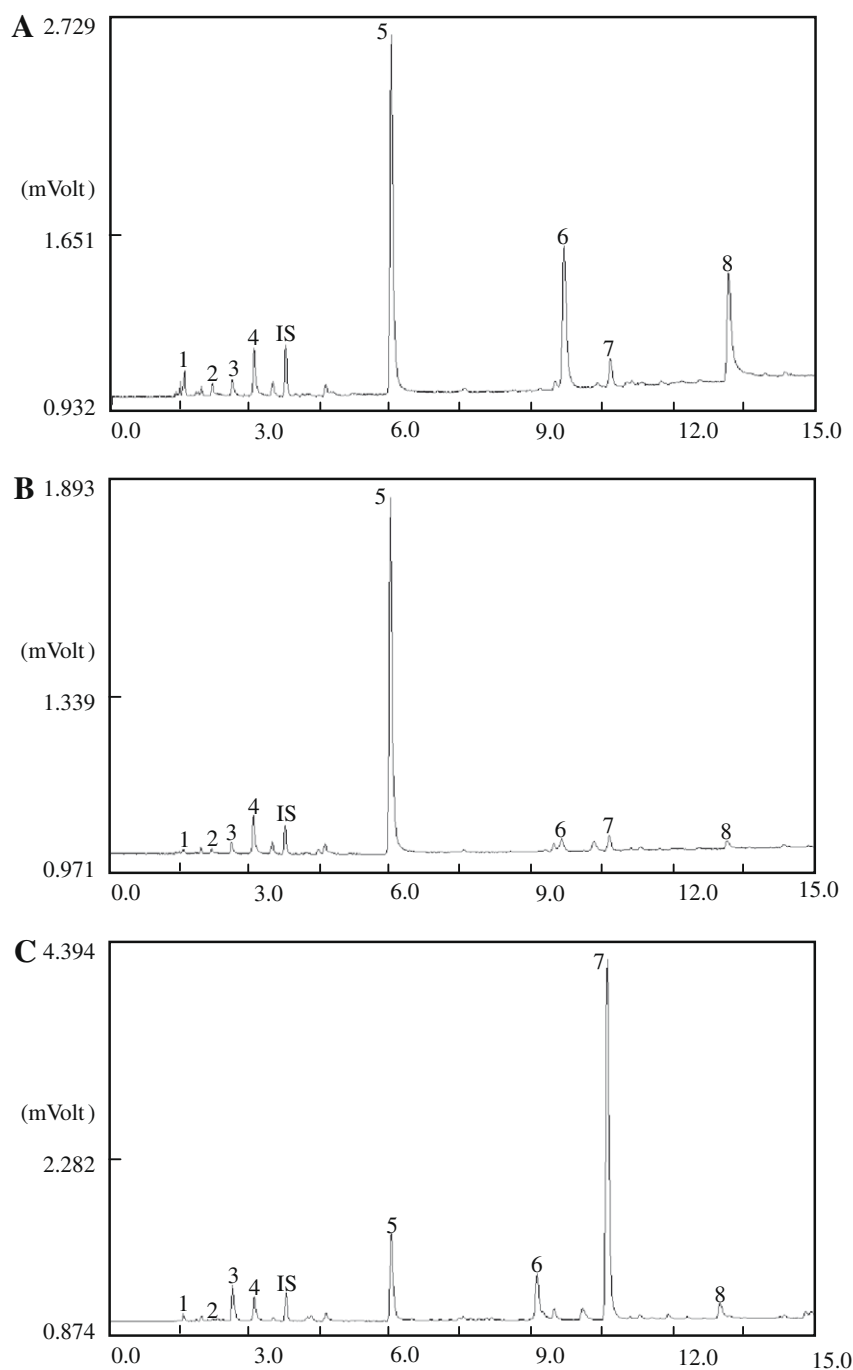


Fig. 3. Volatile compounds profiles of frozen *F. carica* var. "Pingo de Mel": (A) peel, (B) pulp and (C) leaf. Peaks: (1) acetaldehyde, (2) ethyl acetate, (3) methanol, (4) ethanol, (5) hexanal, (6) limonene, (7) (*E*)-2-hexenal, (8) octanal, (IS) acetonitrile.

varieties we can observe that they have very similar volatiles composition. In a general way, lyophilised samples presented higher quantities of these compounds. In addition, total volatile content was different among the three vegetal materials, following the order leaves > peels > pulps (Table 4).

The major volatile is methanol, representing 54.8% of total identified compounds in the pulp, 60.6% in peel and 79.7% in leaves of frozen samples (Fig. 4A). The same is observed for the lyophilised samples, corresponding to 65.7%, 73.1% and 86.8% in pulps, peels and leaves, respectively (Fig. 4B). Methanol is emitted by actively growing plant tissues and ripening fruit (Nemecek-Marshall, MacDonald, Franzen, Wojciechowski, & Fall, 1995). A major source of

methanol may be pectin methyl esters that are de-esterified to methanol and pectic substances by a PME1 (pectin methyl esterase) catalysed reaction (Wood & Siddiqui, 1971). Although methanol production is correlated with PME activity in germinating seeds or other plant tissues (Nemecek-Marshall et al., 1995), the role of PME in methanol accumulation in plants has not been firmly established (Moustakas et al., 1986).

Ethanol is the second major volatile compound, representing 31.8% of total identified compounds in pulp, 30.1% in peel and 16.5% in leaves of frozen samples (Fig. 4A). The same happens in the lyophilised samples, in which this compound represented 19.7%, 21.2% and 10.6% in pulps, peels and leaves, respectively

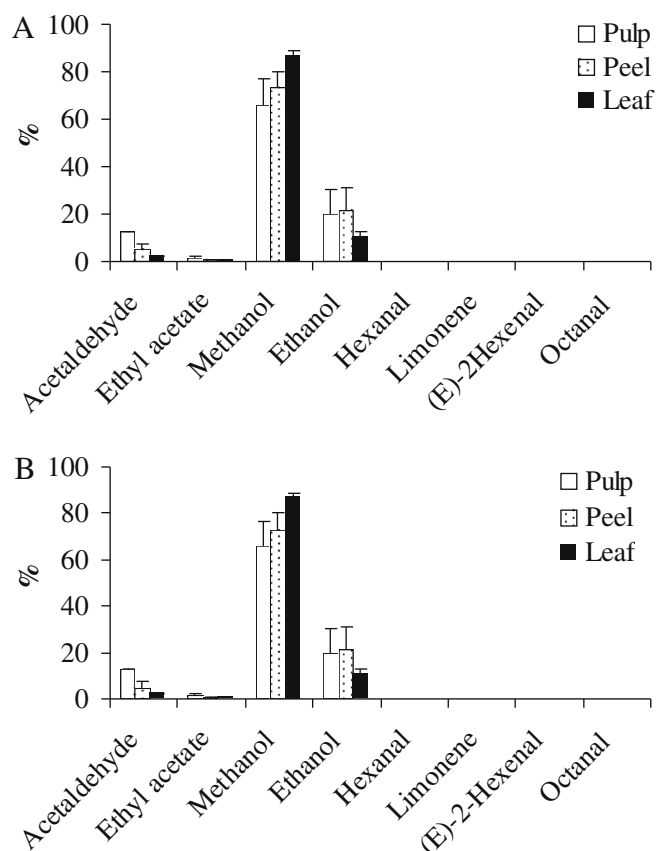


Fig. 4. Volatile compound profiles of frozen (A) and lyophilised (B) pulp, peel and leaf of the *F. carica*. Results show mean \pm SD of the two varieties.

(Fig. 4B). Acetaldehyde was the third main volatile accounting for 10.8% in frozen pulp, 7.4% in peel and 2.8% in leaves. This feature was also observed in lyophilised material: 12.8%, 4.9% and 2.0% in pulps, peels and leaves, respectively (Table 4).

Ethanol is formed in many fruits during the ripening process, together with volatile acids and esters (Pesis, 2005). Acetaldehyde is also a normal constituent of plant tissues (it is a natural aroma) and accumulates during ripening, even under aerobic conditions (Fidler, 1968). Both ethanol and acetaldehyde are precursors of natural aroma compounds. Acetaldehyde in fruits is obtained from pyruvate by the enzyme pyruvate decarboxylase (PDC). The two immediate products formed from acetaldehyde are ethanol, by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH), and acetyl coenzyme A (CoA), by the enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH). As it happens with other fruits, the increases in acetaldehyde and ethanol may be correlated with a decrease in pyruvate and increases in these enzymes activities (Cossins, 1978).

Esters are important contributors for fruit aroma. Volatile esters are generated by esterification of alcohols and acyl-CoAs derived from both fatty acid and amino acid metabolism, in a reaction catalysed by the enzyme alcohol *o*-acyltransferase (AAT) (Lara et al., 2003). When compared with the alcohols or acetaldehyde, ethyl acetate was found in lower levels in the three frozen and lyophilised vegetal tissues (Table 4 and Fig. 4).

Aroma is one of the essential factors for the evaluation of fruit quality, with the volatile components being determinant. In fact, the aroma of fruits and leaves is the result of a complex mixture of esters, alcohols, aldehydes, terpenoid compounds and others, at low concentrations (Nie, Sun, & Huang, 2004). Other identified compounds certainly contribute to different extents to the pleasant aroma and taste of fruit vegetal materials.

Table 4
Volatile compounds contents in *F. carica* samples (mg/kg).^a

Volatile compounds	"Pingo de Mel"						"Branca Tradicional"					
	Frozen			Lyophilised			Frozen			Lyophilised		
	Pulp	Peel	Leaf	Pulp	Peel	Leaf	Pulp	Peel	Leaf	Pulp	Peel	Leaf
Acetaldehyde	73.8 (1.86)	76.8 (2.60)	54.4 (0.95)	79.7 (9.99)	65.9 (5.29)	55.5 (3.97)	73.0 (3.05)	76.1 (3.47)	53.6 (2.00)	139.9 (13.4)	110.0 (7.22)	53.3 (0.84)
Ethyl acetate	15.2 (0.60)	15.7 (0.37)	14.8 (0.58)	14.0 (0.34)	13.7 (0.41)	13.9 (0.53)	15.3 (0.70)	15.7 (0.84)	15.5 (1.53)	13.2 (0.58)	13.8 (0.22)	13.5 (0.28)
Methanol	400.7 (24.5)	509.8 (26.3)	1330.6 (24.1)	365.2 (66.0)	1417.6 (102.9)	2734.2 (245.3)	349.1 (41.2)	753.6 (26.3)	1876.2 (107.4)	799.4 (53.2)	1303.9 (122.2)	2061.3 (219.4)
Ethanol	255.2 (34.7)	395.5 (72.9)	253.1 (19.4)	170.9 (3.85)	585.4 (65.7)	388.8 (40.1)	184.0 (14.6)	223.2 (19.4)	422.6 (33.7)	134.1 (19.6)	238.0 (44.1)	212.4 (34.3)
Hexanal	1.91 (0.16)	4.64 (0.70)	0.81 (0.13)	0.93 (0.19)	2.48 (0.36)	0.34 (0.03)	0.15 (0.02)	1.52 (0.14)	0.14 (0.02)	nq	1.50 (0.16)	nq
Limonene	2.18 (0.004)	0.40 (0.05)	1.14 (0.19)	0.33 (0.04)	0.67 (0.13)	0.34 (0.03)	0.67 (0.15)	0.52 (0.09)	1.15 (0.13)	0.33 (0.04)	0.57 (0.07)	0.33 (0.03)
(E)-2-Hexenal	0.09 (0.01)	0.05 (0.01)	4.23 (0.45)	nq	nq	3.28 (0.25)	nq	0.21 (0.02)	2.36 (0.20)	nq	0.27 (0.01)	0.55 (0.04)
Octanal	0.39 (0.06)	0.06 (0.01)	0.15 (0.04)	0.05 (0.01)	0.06 (0.01)	0.02 (0.01)	0.21 (0.12)	0.05 (0.01)	0.04 (0.01)	0.03 (0.01)	0.05 (0.01)	0.02 (0.01)
Σ	749.47	1002.95	1659.23	631.11	2085.81	3196.38	622.43	1070.90	2371.59	1086.96	1668.09	2341.40

^a Values are expressed as mean (SD) of three determinations; nq, not quantifiable.

Lyophilisation is a method of tissue preparation, in which the tissue specimen is frozen and then dehydrated at low temperature, under a high vacuum. Due to the absence of water, the lyophilisation process protects the samples from enzyme and microbial activities, enlarging their storage time without degradation.

The results obtained with lyophilised samples (Table 4 and Fig. 4) indicate some differences between the two treatments (freezing and lyophilisation) applied to *F. carica* samples. In a general way, there is a decrease in the volatiles contents of lyophilised samples, except for acetaldehyde and methanol. This fact may be related to the specific characteristics of the matrix. Methanol and acetaldehyde are frequently associated with other compounds, such as pectines and amines, respectively (Pesis, 2005; Yoo et al., 2009). May be during the lyophilisation process those complexes are broken, releasing these compounds and contributing to the increase of their contents when compared with frozen samples.

4. Conclusions

The proposed HS-SPME combined with GC/FID procedure for volatile compounds determination in *F. carica* is simple, sensitive, reproducible and accurate for low molecular weight volatiles, like acetaldehyde, ethyl acetate, methanol and ethanol. This method has the main advantage of being low cost, very rapid and needing less labourious sample preparation than other conventional techniques utilised for analysis of fruits by GC, which renders it suitable for the routine analysis of volatile compounds in quality control.

Acknowledgements

Andreia P. Oliveira (SFRH/BD/47620/2008) is indebted to FCT for the grant.

References

- Barroso, M., Gallardo, E., Margalho, C., Ávila, S., Marques, E. P., & Vieira, D. N. (2005). Application of solid phase microextraction to the determination of strychnine in blood. *Journal of Chromatography B*, 816, 29–34.
- Beaulieu, J. C. M., & Grimm, C. C. (2001). Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental states using solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1345–1352.
- Botondi, R., De Santis, D., Bellicontro, A., Vizovitis, K., & Mencarelli, F. (2003). Influence of ethylene inhibition by 1-methylcyclopropene on apricot quality, volatile production, and glycosidase activity of low- and high-aroma varieties of apricots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1189–1200.
- Buttery, R. G., Flath, R. A., Mon, T. R., & Ling, L. C. (1986). Identification of germacrene D in walnut and fig leaf volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 820–822.
- Cossins, E. A. (1978). Ethanol metabolism in plants. In D. D. Hook & R. M. M. Crawford (Eds.), *Plant life in anaerobic environments* (pp. 169–202). Ann Arbor, Mich: Ann Arbor Science.
- Dong, C., Mei, Y., & Chen, L. (2006). Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1117, 109–114.
- Douillard, C., & Guichard, E. (1990). The aroma of strawberry (*Fragaria ananassa*): characterization of some cultivars and influence of freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 517–531.
- Ferrari, A., Arado, M. G., Nardo, C. A., & Giannuzzi, L. (2003). Post-mortem analysis of formic acid disposition in acute methanol intoxication. *Forensic Science International*, 133, 152–158.
- Fidler, J. C. (1968). The metabolism of acetaldehyde by plant tissues. *Journal of Experimental Botany*, 19, 1–15.
- Food and Drug Administration (2001). *Guidance for industry: Bioanalytical method validation*. Retrieved 13th October 2009. Available from <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- Gibernau, M., Buser, H. R., Frey, J. E., & Hossaert-McKey, M. (1997). Volatile compounds from extracts of figs of *Ficus carica*. *Phytochemistry*, 46, 241–244.
- Grisson, L., Edwards, A. A., & Hossaert-McKey, M. (1999). Interspecies variation in floral fragrances emitted by tropical *Ficus* species. *Phytochemistry*, 52, 1293–1299.
- Grisson-Pigé, L., Hossaert-McKey, M., Greeff, J. M., & Bessière, J.-M. (2002). Fig volatile compounds – A first comparative study. *Phytochemistry*, 61, 61–71.
- Guedes de Pinho, P., Gonçalves, R. F., Valentão, P., Pereira, D. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., et al. (2009). Volatile composition of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 674–685.
- Guedes de Pinho, P., Ribeiro, B., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Valentão, P., Seabra, R. M., et al. (2008). Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1704–1712.
- Ibañez, E., Lopez-Sebastian, S., Ramos, E., Tabera, J., & Reglero, G. (1998). Analysis of volatile fruit components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 63, 281–286.
- Lara, I., Miró, R. M., Fuentes, T., Sayez, G., Graell, J., & López, M. L. (2003). Biosynthesis of volatile aroma compounds in pear fruit stored under long-term controlled-atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 29, 29–39.
- Lin, J. M., Rouseff, R. L., Barros, S., & Naim, M. (2002). Aroma composition changes in early season grapefruit juice produced from thermal concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 813–819.
- Moustakas, A. M., Nari, J., Diamantidis, G., Noat, G., Crasnier, M., Borel, M., et al. (1986). Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 2. The role of pectin methyl esterase in the modulation of electrostatic effects in soybean cell walls. *European Journal of Biochemistry*, 155, 191–197.
- Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R. C., Franzen, J. J., Wojciechowski, C. L., & Fall, R. (1995). Enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development. *Plant Physiology*, 108, 1359–1368.
- Nie, L. C., Sun, J. S., & Huang, R. H. (2004). The biosynthesis and affecting factors of aroma in some fruits. *Chinese Bulletin of Botany*, 21, 631–637.
- Oliveira, A. P., Valentão, P., Pereira, J. A., Silva, B. M., Tavares, F., & Andrade, P. B. (2009). *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2841–2846.
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid phase microextraction. *Journal of Chromatography Science*, 38, 270–278.
- Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., Calvo, R. M., & Tadeo, J. L. (2002). Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2633–2637.
- Pesis, E. (2005). The role of anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 1–19.
- Portari, G. V., Marchini, J. S., & Jordão, A. A. (2008). Validation of a manual headspace gas chromatography method for determining volatile compounds in biological fluids. *Labmedicine*, 39, 42–45.
- Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López-Tamames, E., Galassi, S., & Buxaderas, S. (2004). Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chemistry*, 87, 627–637.
- Rizzolo, A., Polesello, A., & Polesello, S. (1992). Use of headspace capillary GC to study the development of volatile compounds in fresh fruit. *Journal of High Resolution Chromatography*, 15, 472–477.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., et al. (2006). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7717–7723.
- Veberic, R., Colaric, M., & Stampar, F. (2008). Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. *Food Chemistry*, 106, 153–157.
- Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., & Proch, J. (2005). Dried fruits: Excellent in vitro and in vivo antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 44–50.
- Wasfi, I. A., Al-Awadhi, A. H., Al-Hatali, Z. N., Al-Rayami, F. J., & Al-Katheeri, N. A. (2004). Rapid and sensitive static headspace gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. *Journal of Chromatography B*, 799, 331–336.
- Wood, P. J., & Siddiqui, I. R. (1971). Determination of methanol and its application to measurement of pectinester content and pectin methylesterase activity. *Analytical Biochemistry*, 39, 418–428.
- Yoo, Y.-H., Lee, S., Kim, Y., Kim, K.-O., Kim, Y.-S., & Yoo, S.-H. (2009). Functional characterization of the gels prepared with pectin methylesterase (PME)-treated pectins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 226–230.

5.3. Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC-IT-MS

Food Chem. 2010, 123, 548-557



Analytical Methods

Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC–IT-MS

Andreia P. Oliveira^a, Luís R. Silva^a, Paula Guedes de Pinho^{b,*}, Angel Gil-Izquierdo^c, Patrícia Valentão^a, Branca M. Silva^{a,d}, José A. Pereira^e, Paula B. Andrade^{a,**}

^a REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

^b REQUIMTE/Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

^c Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC), P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain

^d CEBIMED/Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia 296, 4200-150 Porto, Portugal

^e CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2010

Received in revised form 9 March 2010

Accepted 27 April 2010

Keywords:

Ficus carica

Volatile compounds

HS-SPME

GC–IT-MS

PCA

ABSTRACT

Aroma is one of the essential parameters for the evaluation of fruit quality, with volatile components being determinant for this characteristic. During this work, the volatile profile of fresh fruits (pulp and peel) and leaves of Portuguese *Ficus carica* L. white ("Pingo de Mel" and "Branca Tradicional") and dark ("Borrasota Tradicional", "Verbera Preta" and "Preta Tradicional") varieties were characterised by HS-SPME/GC–IT-MS.

Fifty-nine compounds were identified and distributed by distinct chemical classes (aldehydes, alcohols, ketones, esters, monoterpenes, sesquiterpenes, norisoprenoids), with 39 being reported for the first time in this species. Principal component analysis of semi-quantitative data showed that pulps and peels are distinguished from leaves by their abundance of monoterpenes and aldehydes. All varieties presented a similar volatile profile, although some differences between white and dark varieties were noticed.

This is the first study comparing volatile composition of several materials from *F. carica*. In addition, no previous study involved the above mentioned varieties.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Fruit quality is determined by several parameters, including the aroma of the fruit. The analysis of aroma's compounds, plays an important role in the process of quality fruit breeding. Qualitative and quantitative information are desired in order to monitor aroma quality and ripeness in plants, fresh and processed fruits, and to provide a relationship between sensorial and volatile contents (Ong et al., 2008).

Volatile compounds in vegetable materials can be derived from amino acids, fatty acids and carbohydrate compounds (Guedes de Pinho, Pereira, et al., 2009). For most fruits, the typical flavour is not present at harvest, but develops during the ripening process. The volatile compounds present in fresh and processed fruits affect significantly the flavour and quality of the aroma, which is formed by a complex mixture of aldehydes, alcohols, ketones, esters, lactones, terpenes and other compounds (Riu-Aumatell, Castellari,

López-Tamames, Galassi, & Buxaderas, 2004). Plant volatiles are involved in species-specific ecological interactions and there are to be associated with defensive and attractive roles (Schwab, Davidovich-Rikanati, & Lewinsohn, 2008).

Most of traditional methods used for extraction and pre-concentration of volatile compounds are very time consuming and require exhaustive concentration steps. Solid-phase microextraction (SPME) is a solventless extraction alternative and does not induce modifications of volatile compounds due to temperature or solvent effect. This type of extraction involves the adsorption of analytes onto a fused silica fibre coated with a suitable stationary phase and their subsequent desorption immediately before chromatographic analysis (Pawliszyn, 2000). Head Space-SPME (HS-SPME) coupled with gas chromatography–ion trap-mass spectrometry (GC–IT-MS) is a valuable technique for the analysis of volatile compounds and has been widely used in vegetable species (Fernandes, Guedes de Pinho, Valentão, Pereira, & Andrade, 2009; Guedes de Pinho, Gonçalves, et al., 2009; Taveira, Guedes de Pinho, Gonçalves, Andrade, & Valentão, 2009).

Ficus carica L. is one of the earliest cultivated fruit trees. The main fig producers are Mediterranean countries, where they play an important economical role. In addition, this fruit is widely used

* Corresponding author. Tel.: +351 222078908; fax: +351 222003977.

** Corresponding author. Tel.: +351 222078934; fax: +351 222003977.

E-mail addresses: pguedes@ff.up.pt (P. Guedes de Pinho), pandrade@ff.up.pt (P.B. Andrade).

Table 1
Volatile composition of five Portuguese varieties of *Ficus carica* leaves.

Compounds		RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A ^d /1000 (S.D.)				
					Pingo de Mel	Branca Tradicional	Borrasota Tradicional	Verbera Preta	Preta Tradicional
Aldehydes									
1	3-Methyl-butanal	740	S, MS (82/84)	41/44/58	2.84(0.18)	nd	38.9(0.19)	4.46(0.79)	7.64(0.21)
2	2-Methyl-butanal	748	S, MS (79/81)	41/57	4.87(0.00)	nd	34.8(2.18)	6.27(0.11)	13.1(0.09)
3	(E)-2-Pentenal	847	MS (79/82)	55/83	2.42(0.43)	2.13(0.17)	14.7(0.97)	1.23(0.09)	5.01(0.99)
4	Hexanal	891	S, MS (79/81)	41/55/67/82	0.72(0.18)	2.96(0.05)	9.32(0.10)	1.25(0.11)	2.41(0.38)
5	(E)-2-Hexenal	941	S, MS (83/88)	41/55/69/83	0.53(0.10)	2.17(0.17)	8.86(1.20)	1.15(0.07)	2.44(0.18)
				Total aldehydes	11.4	7.27	107	14.4	30.6
Alcohols									
6	1-Penten-3-ol	767	MS (83/86)	57/67	108(1.27)	101(0.44)	180(3.37)	42.9(0.51)	133(7.11)
7	3-Methyl-1-butanol	824	S, MS (81/83)	56/71	23.1(2.51)	nd	38.1(1.45)	19.5(2.82)	nd
8	2-Methyl-1-butanol	828	S, MS (84/85)	56/70	35.5(5.03)	17.0(0.30)	11.4(1.45)	12.6(0.43)	19.6(0.03)
9	1-Heptanol	1063	S, MS (74/88)	41/56/70/116	nd	4.59(0.17)	nd	5.29(0.16)	5.49(0.48)
10	Benzyl alcohol	1127	S, MS (79/79)	79/108	177(8.15)	241(4.41)	78.3(0.47)	159(1.82)	175(3.71)
11	(E)-2-Nonen-1-ol	1194	S, MS (84/85)	57/70/82	13.3(0.13)	14.2(0.10)	12.4(1.56)	nd	8.95(0.42)
12	Phenylethyl alcohol	1202	S, MS (85/86)	91/122	159(15.2)	95.2(1.00)	36.4(7.02)	143(3.66)	196(0.33)
				Total alcohols	515	473	356	382	538
Ketones									
13	3-Pentanone	781	MS (77/81)	57/86	38.4(1.57)	38.3(0.89)	46.8(3.72)	12.4(0.56)	31.0(0.30)
				Total ketones	38.4	38.3	46.8	12.4	31.0
Esters									
14	Methyl butanoate	807	MS (74/85)	43/71/77	nd	0.71(0.08)	nd	nd	nd
15	Methyl hexanoate	1014	S, MS (84/88)	74/87/99	nd	1.92(0.15)	nd	0.70(0.10)	nd
16	Hexyl acetate	1101	S, MS (83/84)	43/56/61/84	20.5(0.52)	16.4(0.22)	2.69(0.71)	6.49(0.08)	4.07(0.83)
17	Ethyl benzoate	1262	MS (81/89)	77/105/150	27.8(5.61)	6.27(0.93)	19.7(4.33)	86.4(3.45)	33.6(2.27)
18	Methyl salicylate	1284	S, MS (78/80)	92/120/152	1564(137)	869(110)	147(25.2)	977(36.8)	1440(104)
				Total esters	1612	894	165	1071	1477
Monoterpenes									
19	Limonene	1119	S, MS (84/89)	68/93	21.5(2.08)	15.1(0.60)	17.4(0.66)	12.8(0.12)	9.90(0.28)
20	Menthol	1269	S, MS (85/88)	81/95/123	2.39(0.20)	1.88(0.09)	2.13(0.57)	2.37(0.06)	1.99(0.09)
				Total monoterpenes	23.9	17.0	19.5	15.2	11.9

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Compounds		RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A ^d /1000 (S.D.)				
					Pingo de Mel	Branca Tradicional	Borrasota Tradicional	Verbera Preta	Preta Tradicional
<i>Sesquiterpenes</i>									
21	α -Cubenene	1371	MS (87/88)	105/119/161	20.1(3.06)	38.8(6.48)	28.7(8.85)	4.65(0.01)	19.7(0.85)
22	α -Guaiene	1375	MS (76/80)	95/147	1.16(0.14)	1.08(0.04)	5.22(0.79)	0.36(0.05)	0.67(0.02)
23	α -Ylangene	1382	MS (87/88)	105/119/161	8.95(0.68)	22.3(2.76)	6.43(1.78)	5.67(0.11)	12.5(0.65)
24	Copaene	1384	MS (85/86)	105/119/161	68.5(9.61)	63.9(4.69)	111(8.45)	56.5(0.76)	40.3(1.26)
25	β -Bourbonene	1388	MS (84/85)	81/123/161	103(8.64)	96.9(1.93)	35.3(10.6)	10.9(1.48)	62.7(4.58)
26	β -Elemene	1390	MS (84/85)	67/81/93	0.76(0.07)	68.2(4.37)	64.1(6.77)	35.3(0.39)	75.9(10.5)
27	α -Gurjunene	1398	MS (86/87)	161/189/204	6.45(1.72)	11.2(0.89)	7.47(2.03)	7.61(0.80)	9.62(0.44)
28	β -Caryophyllene	1408	S, MS (92/92)	161/189/204	56.8(16.16)	34.3(4.37)	1519(315)	20.8(0.51)	19.7(2.56)
29	β -Cubebene	1419	MS (87/87)	105/119/161	24.6(3.42)	40.2(3.65)	4.22(0.07)	nd	19.0(3.55)
30	Alloaromadendrene	1429	MS (87/88)	105/119/161	7.14(1.25)	120(8.05)	60.0(13.2)	104(2.25)	128(18.0)
31	α -Caryophyllene	1446	MS (76/81)	80/93/121	51.9(4.98)	31.3(0.97)	461(71.5)	4.12(0.64)	15.1(3.32)
32	τ -Muurolene	1467	MS (82/82)	105/161/204	116(33.3)	204(45.0)	21.6(4.68)	9.64(0.91)	97.9(10.1)
33	Germacrene D	1473	MS (86/89)	105/119/161	1366(367)	1923(352)	319(78.5)	115(3.59)	1068(70.0)
34	(+)-Ledene	1481	MS (86/89)	105/119/161	104(12.6)	nd	136(0.84)	36.5(5.72)	40.6(0.57)
35	τ -Elemene	1486	MS (80/81)	93/107/121	26.2(2.55)	247(51.7)	391(81.1)	485(33.3)	606(47.5)
36	τ -Cadinene	1503	MS (90/90)	105/119/161	100(17.9)	199(20.7)	23.1(0.78)	4.79(0.75)	102(16.3)
37	α -Muurolene	1528	MS (87/90)	105/161/204	33.3(6.26)	71.8(11.7)	8.13(1.56)	4.71(0.71)	31.3(3.89)
				Total sesquiterpenes	1991	3308	3101	910	2411
<i>Norisoprenoid</i>									
38	β -Cyclocitral	1305	S, MS (83/84)	123/152	12.2(1.05)	6.87(0.12)	9.51(1.92)	10.2(0.89)	8.52(0.49)
				Total norisoprenoids	12.2	6.87	9.51	10.2	8.52
<i>Miscellaneous compounds</i>									
39	τ -Nonalactone	1379	MS (75/76)	57/85/156	2.54(0.33)	5.10(0.87)	nd	nd	3.86(0.18)
40	Psoralen	1852	S, MS (87/90)	158/186	1875(67.2)	2095(116)	2273(16.3)	2213(4.62)	1930(185)
				Total miscellaneous	1877	2100	2273	2213	1934
				Total compounds area	6081	6845	6077	4628	6442

^a RI = retention index.^b ID = Identification method; S = identified by comparison with reference compounds; MS = tentatively identified by NIST05 (fit/retrofit values, %).^c QI = quantification ions.^d Area expressed as arbitrary units; S.D. = standard deviation of three assays; nd = not detected.

Table 2
Volatile composition of five Portuguese varieties of *Ficus carica* fruits (peels and pulps).

Compounds		RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A ^d /1000 (S.D.)									
					Pingo de Mel		Branca Tradicional		Borrasota Tradicional		Verbera Preta		Preta Tradicional	
					Peels	Pulps	Peels	Pulps	Peels	Pulps	Peels	Pulps	Peels	Pulps
Aldehydes														
1	3-Methyl-butanal	740	S, MS (79/81)	41/44/58	nd	6.14(0.54)	nd	4.12(0.03)	nd	1.24(0.01)	nd	9.50(0.95)	nd	5.93(0.26)
2	2-Methyl-butanal	748	S, MS (78/84)	41/57	nd	2.27(0.08)	nd	1.01(0.01)	nd	0.66(0.04)	nd	3.10(0.02)	nd	3.29(0.05)
41	2-Methyl-2-butanal	831	MS (81/84)	84/55	nd	31.8(0.08)	nd	2.20(0.16)	nd	0.11(0.01)	nd	9.53(2.21)	nd	1.78(0.06)
3	(E)-2-Pentenal	848	MS (78/80)	55/83	2.27(0.27)	0.55(0.08)	0.30(0.03)	0.76(0.03)	15.5(0.97)	nd	0.18(0.02)	0.88(0.07)	3.48(0.07)	1.37(0.02)
4	Hexanal	891	S, MS (80/81)	41/55/67/82	nd	23.6(2.74)	nd	12.0(0.64)	nd	18.7(0.18)	nd	25.8(2.10)	nd	5.40(0.20)
5	(E)-2-Hexenal	856	S, MS (85/92)	41/55/69/83	70.9(0.29)	63.7(1.08)	5.06(0.18)	72.0(3.00)	360(0.21)	218(3.52)	79.4(3.99)	159(0.28)	174(4.67)	191(21.3)
42	Heptanal	990	S,MS (79/80)	55/57/70	2.58(0.22)	5.56(0.49)	2.55(0.29)	2.56(0.17)	1.57(0.06)	2.85(0.08)	3.85(0.30)	5.03(0.14)	58.7(4.11)	nd
43	(Z)-2-Heptanal	1051	MS (74/86)	55/69/83	nd	nd	1.70(0.29)	0.67(0.06)	nd	1.12(0.02)	0.74(0.02)	1.18(0.08)	nd	0.96(0.10)
44	Benzaldehyde	1056	S, MS (83/84)	71/105	280(24.7)	75.3(6.31)	25.1(2.29)	175(29.2)	83.7(5.18)	67.7(0.25)	144(6.41)	440(88.3)	127(2.04)	73.0(13.0)
45	(E, E)-2,4-Heptadienal	1090	MS (52/80)	53/81	1.09(0.08)	nd	6.37(0.79)	nd	32.5(0.94)	nd	4.07(0.06)	nd	4.31(0.24)	nd
46	Octanal	1093	S, MS (79/80)	67/81/95	4.64(0.23)	7.41(0.69)	2.85(0.30)	5.57(0.58)	4.39(0.39)	5.09(0.12)	3.93(0.16)	6.17(0.60)	5.18(0.20)	5.14(1.32)
47	(E)-2-Octenal	1151	S, MS (83/84)	70/93	1.01(0.03)	0.68(0.12)	1.19(0.04)	0.53(0.07)	1.54(0.31)	0.67(0.21)	1.58(0.04)	0.72(0.20)	1.17(0.08)	0.71(0.17)
48	Nonanal	1193	S, MS (85/86)	57/81/95	nd	31.4(1.45)	nd	19.2(0.82)	nd	19.5(1.10)	nd	26.3(0.33)	nd	25.3(0.12)
49	(E, Z)-2,6-Nonadienal	1245	S, MS (81/85)	70/95/137/152	1.76(0.12)	1.86(0.22)	0.67(0.12)	3.73(0.57)	nd	0.28(0.09)	2.07(0.25)	1.52(0.09)	2.55(0.07)	6.38(0.34)
				Total aldehydes	364	250	45.8	299	500	336	240	689	376	320
Alcohols														
6	1-Penten-3-ol	767	MS (83/86)	57/67	15.9(0.61)	nd	15.8(1.70)	nd	15.5(0.97)	nd	6.22(0.21)	nd	7.61(0.56)	nd
50	(Z)-3-Hexen-1-ol	802	MS (84/89)	57/67/82	1.48(0.15)	nd	nd	nd	2.26(0.45)	nd	nd	nd	nd	nd
7	3-Methyl-1-butanol	824	S, MS (81/83)	56/71	0.42(0.03)	nd	0.66(0.03)	nd	1.81(0.10)	nd	1.02(0.01)	nd	0.51(0.04)	nd
10	Benzyl alcohol	1128	S, MS (82/87)	79/108	36.4(0.48)	1.94(0.15)	0.46(0.02)	1.79(0.12)	0.58(0.05)	nd	0.62(0.09)	nd	0.30(0.01)	nd
11	(E)-2-Nonen-1-ol	1194	S, MS (84/85)	57/70/82	18.6(1.21)	nd	16.8(0.70)	nd	nd	nd	11.5(0.97)	nd	22.1(3.05)	nd
12	Phenylethyl alcohol	1202	S, MS (81/87)	91/122	5.02(0.05)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18.7 (0.70)	6.12(0.03)
				Total alcohols	77.8	1.94	33.6	1.79	20.1	0.00	19.4	0.00	49.2	6.12
Ketones														
51	6-Methyl-5-hepten-2-one	1076	S, MS (76/87)	67/108	nd	4.31(0.54)	4.95(0.50)	3.69(0.36)	nd	10.9(0.55)	2.71(0.22)	5.22(1.08)	nd	nd
				Total ketones	0.00	4.31	4.95	3.69	0.00	10.9	2.71	5.22	0.00	0.00
Esters														
15	Methyl hexanoate	1014	S, MS (82/86)	74/87/99	2.83(0.18)	1.46(0.24)	5.44(0.30)	0.92(0.28)	6.66(0.05)	0.80(0.19)	2.15(0.10)	0.82(0.05)	3.74(0.26)	1.06(0.21)
18	Methyl salicylate	1283	S, MS (91/91)	92/120/152	6.81(0.77)	190(24.3)	7.76(0.29)	1.35(0.08)	3.43(0.17)	6.26(0.71)	13.4(1.40)	3.35(0.04)	35.1(2.04)	18.0(3.93)
52	Ethyl salicylate	1332	MS (90/91)	93/120/166	nd	23.7(0.54)	nd	0.69(0.10)	nd	1.17(0.23)	nd	1.88(0.07)	nd	13.7(3.32)
				Total esters	9.19	215	13.2	2.96	10.1	8.23	15.6	6.05	38.8	32.8
Monoterpenes														
53	α -Pinene	1024	S, MS (83/86)	77/93	0.59(0.04)	0.98(0.07)	0.82(0.07)	0.91(0.07)	0.51(0.02)	0.81(0.07)	0.66(0.04)	0.75(0.08)	0.79(0.08)	0.78(0.09)
54	β - Pinene	1080	S, MS (72/83)	69/93	0.51(0.05)	nd	0.36(0.06)	nd	0.46(0.03)	nd	nd	nd	0.10(0.01)	nd
19	Limonene	1119	S, MS (84/89)	83/87	15.9 (2.62)	36.0(3.48)	18.2(1.66)	20.5(5.00)	39.5(7.85)	12.7(0.28)	21.1 (0.99)	20.9 (5.70)	18.4(0.65)	11.8(0.62)
55	Eucalyptol	1123	S, MS (80/87)	81/93/108	1.31(0.23)	1.36(0.08)	0.56(0.02)	1.81(0.20)	1.43(0.10)	1.54(0.02)	1.82(0.05)	1.61(0.24)	2.86(0.14)	2.83(0.17)
56	Linalool	1188	S, MS (83/86)	55/71/93/121	nd	91.4(21.5)	nd	15.6(0.70)	nd	20.5(2.33)	nd	11.2(0.98)	nd	13.7(0.25)
57	Epoxylinalool	1262	MS (76/80)	68/94	nd	13.2(0.28)	nd	1.28(0.05)	nd	2.86(0.18)	nd	9.84(2.89)	nd	2.45(0.53)
20	Menthol	1269	S, MS (88/91)	81/95/123	3.48(0.20)	3.15(0.06)	2.36(0.20)	2.93(0.09)	3.28(0.21)	1.72(0.09)	1.89(0.08)	2.08(0.37)	5.11(0.16)	2.04(0.04)
				Total monoterpenes	21.8	146	22.3	43.0	45.2	40.1	25.5	46.4	27.3	33.6
Sesquiterpenes														
21	α -Cubenene	1371	MS (76/81)	105/119/161	nd	0.74(0.21)	nd	nd	nd	3.25(0.18)	nd	nd	nd	2.85(0.81)
24	Copaene	1384	MS (77/81)	105/119/161	2.63(0.16)	2.77(0.12)	0.52(0.02)	2.29(0.07)	35.0(7.94)	75.2(3.93)	4.05(0.01)	3.41(0.12)	11.5(1.99)	16.1(4.40)
28	β -Caryophyllene	1392	S, MS (81/86)	161/189/204	0.51(0.05)	0.55(0.10)	0.24(0.02)	nd	17.0(1.65)	25.7(0.61)	0.37(0.11)	0.14(0.04)	4.11(0.27)	1.43(0.70)
58	(E)- α -Bergamotene	1406	MS (87/89)	93/119/204	nd	nd	nd	nd	nd	25.7(0.61)	nd	2.23(1.48)	nd	nd
32	τ -Muurolene	1461	MS (87/89)	105/161/204	3.25(0.31)	4.22(0.34)	2.59(0.12)	nd	2.34(0.00)	3.79(0.91)	0.28(0.02)	nd	38.2(5.72)	7.03(1.55)
33	Germacrene D	1466	MS (81/85)	105/119/161	19.2(1.89)	10.8(1.51)	13.1(1.66)	0.24(0.05)	38.0(0.14)	16.2(1.47)	6.85(0.16)	0.67(0.21)	161(3.73)	44.3(12.2)
36	τ -Cadinene	1507	MS (90/90)	105/119/161	7.54(0.72)	nd	4.62(0.02)	nd	7.38(0.18)	nd	0.54(0.09)	nd	25.5(1.58)	nd
				Total sesquiterpenes	33.2	18.3	21.1	2.53	99.7	127	12.1	6.45	240	68.9

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Compounds	RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	A ^d /1000 (S.D.)					
				Pingo de Mel		Branca Tradicional		Borrasota Tradicional	
				Peels	Pulps	Peels	Pulps	Peels	Pulps
Norisoprenoids 38 β -Cyclocitral	1305	S, MS (82/85)	123/152	nd	0.54(0.09)	nd	0.36(0.13)	nd	0.18(0.03)
			Total norisoprenoids	0.00	0.54	0.00	0.36	0.00	0.18
Miscellaneous compound 59 Eugenol	1375	S, MS (70/87)	77/131/164	0.63(0.04)	0.39(0.09)	0.16(0.02)	0.29(0.04)	0.35(0.05)	0.33(0.01)
			Total miscellaneous	0.63	0.39	0.16	0.29	0.35	0.33
			Total compounds area	507	637	141	354	675	736
								0.43(0.00)	0.79(0.16)
								0.00	0.43
								732	462

^a RI = retention index.^b ID = identification method; S = identified by comparison with reference compounds; MS = tentatively identified by NIST05 (fit/retrofit values, %).^c QI = quantification ions.^d Area expressed as arbitrary units; S.D. = standard deviation of three assays; nd = not detected.

for human consumption, once it is an excellent source of minerals, vitamins and dietary fibre, being associated with longevity and health benefits (Solomon et al., 2006).

Most of the existent bibliography about volatiles in *F. carica* concerns the determination of these compounds in extracts from figs and leaves (Buttery, Flath, Mon, & Ling, 1986; Gibernau, Buser, Frey, & Hossaert-McKey, 1997; Grison-Pigé, Hossaert-McKey, Greeff, & Bessière, 2002). The aim of the present study was to characterise the volatile composition of fresh fruits (pulp and peels) and leaves of two characteristic Portuguese white varieties ("Pingo de Mel" and "Branca Tradicional") and three dark types ("Borrasota Tradicional", "Verbera Preta" and "Preta Tradicional") by HS-SPME/GC-IT-MS. To our knowledge this is the first report comparing volatile composition of several materials from the same *F. carica* variety. In addition, there have been no previous studies on the above mentioned varieties.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

All chemicals used were of analytical grade. The standards compounds were purchased from various suppliers: heptanal, octanal, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, 1-heptanol, 6-methyl-5-hepten-2-one, limonene, linalool, methyl salicylate, 3-methyl-1-butanol, 2-methyl-1-butanol, methyl hexanoate, β -caryophyllene, β -cyclocitral, (*E*)-2-octenal, (*E*)-2-hexenal, nonanal, (*E*)-2-nonen-1-ol, phenylethyl alcohol, and psoralen were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); hexanal, benzaldehyde, phenylethyl alcohol, phenylpropyl alcohol and (*E*, *Z*)-2,6-nonadienal were from SAFC (Steinheim, Germany); α -pinene, β -pinene, hexyl acetate and eucalyptol were from Extrasynthèse (Genay, France), menthol and 1-hexanol were from Fluka (Buchs, Switzerland).

2.2. *Ficus carica* samples

F. carica white ("Pingo de Mel" and "Branca Tradicional") and dark ("Borrasota Tradicional", "Verbera Preta" and "Preta Tradicional") varieties were at the same stage of ripeness. The fruits and leaves were collected in Mirandela region (Northeast Portugal) in September 2009. All materials were immediately transported to the laboratory of Pharmacognosy of Faculty of Pharmacy of Porto University. The edible parts of the fruits were manually prepared, without using steel knives. Peels, pulps and leaves were homogenised, weighted and separated by aliquots. All fresh samples were then analysed.

2.3. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME)

2.3.1. SPME fibres

Several commercial fibres can be used to extract volatiles. According to bibliography, recommendations of supplier (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and to our own knowledge (Guedes de Pinho et al., 2008; Guedes de Pinho, Pereira, et al., 2009; Guedes de Pinho, Gonçalves, et al., 2009), the fibre used was coated with divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS), 65 μ m.

2.3.2. Volatiles extraction

Different conditions were tested in order to optimise the extractive procedure. Preliminary extraction assays with and without water, and for distinct fibre exposure periods (20 and 60 min.), were performed. A higher yield of compounds' extraction was obtained by exposing the fibre to the sample for 60 min, without using water.

Sample was stirred (200 rpm) at 40 °C, for 5 min. The fibre was then exposed to the headspace for 60 min, with agitation (200 rpm) at 40 °C. Afterwards the fibre was pulled into the needle

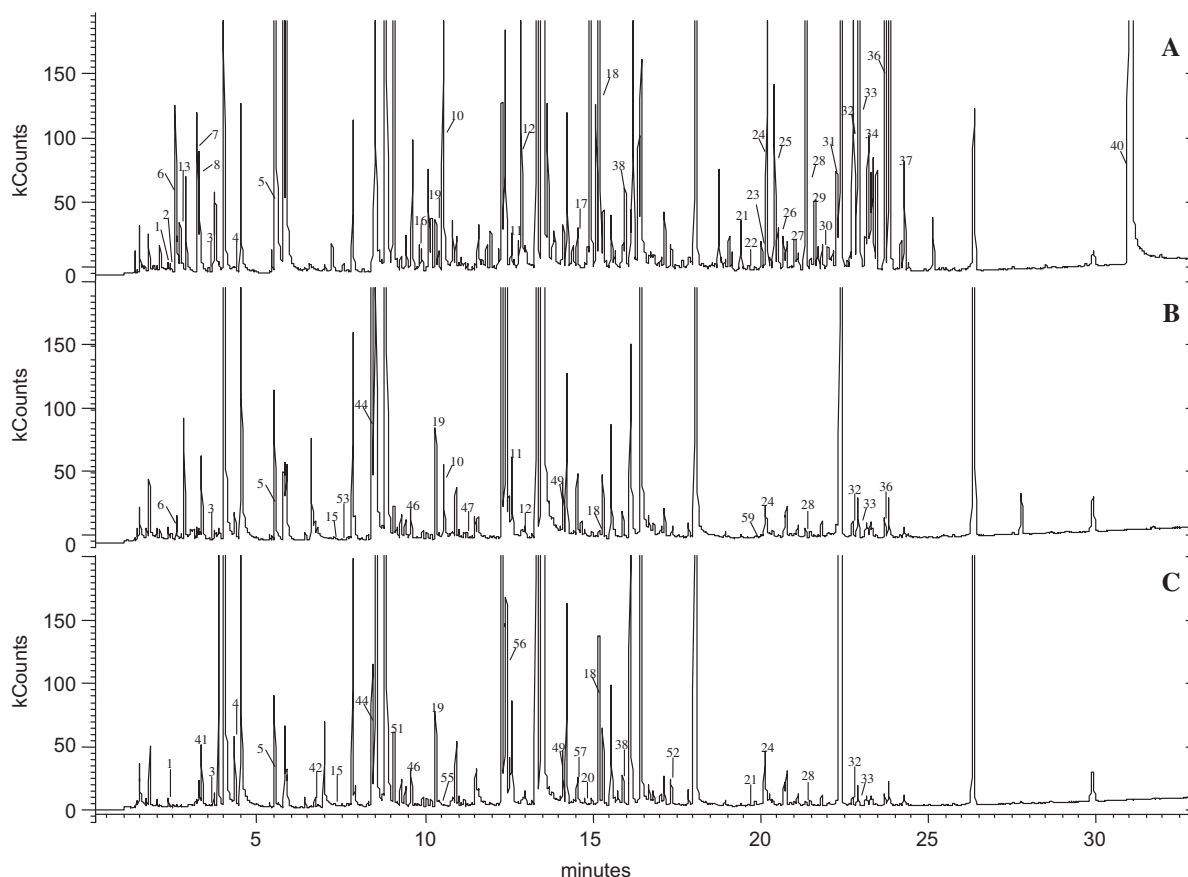


Fig. 1. HS-SPME/GC-MS volatiles chromatogram of *F. carica* “Pingo de Mel” variety (A) leaves, (B) peels and (C) pulps. Compounds: (1) 3-Methyl-butanol; (2) 2-methyl-butanol; (3) (*E*)-2-pentenal; (4) hexanal; (5) (*E*)-2-hexenal; (6) 1-penten-3-ol; (7) 3-methyl-1-butanol; (8) 2-methyl-1-butanol; (10) benzyl alcohol; (11) (*E*)-2-nonen-1-ol; (12) phenylethyl alcohol; (13) 3-pentanone; (15) methyl hexanoate; (16) hexyl acetate; (17) ethyl benzoate; (18) methyl salicylate; (19) limonene; (20) menthol; (21) α -cubenene; (22) α -guaiene; (23) α -ylangene; (24) copaene; (25) β -bourbonene; (26) β -elemene; (27) α -gurjunene; (28) β -caryophyllene; (29) β -cubebene; (30) alloanomadendrene; (31) α -caryophyllene; (32) τ -muurolene; (33) germacrene D; (34) (+)-ledene; (36) τ -cadinene; (37) α -muurolene; (38) β -cyclocitral; (40) psoralen; (42) heptanal; (44) benzaldehyde; (46) octanal; (49) (*E, Z*)-2,6-nonadienal; (51) 6-methyl-5-hepten-2-one; (52) ethyl salicylate; (53) α -pinene; (55) eucalyptol; (56) linalool; (57) epoxylinool and (59) eugenol.

sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption, for 1 min. The fibre was then removed and conditioned in another GC injection port for 10 min at 250 °C.

2.4. Gas chromatography-ion trap-mass spectrometry analysis

GC-IT-MS analysis was performed with a Varian CP-3800 gas chromatograph (USA) coupled to a VARIAN Saturn 4000 mass selective detector (USA) and a Saturn GC/MS workstation software version 6.8. A VF-5 ms 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m (FactorFour) column from VARIAN was used in the analysis. The injector port was heated to 220 °C and injections were performed in splitless mode. The carrier gas was helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 ml/min. Oven temperature was set at 40 °C (for 1 min), then increasing 2 °C/min to 220 °C and held for 30 min. All mass spectra were acquired in electron impact (EI) mode. Ionisation was maintained off during the first minute. Transfer line, manifold and trap temperatures of the ion trap detector were set at 280, 50 and 180 °C, respectively. Covered mass ranged from 40 to 350 m/z, with a scan rate of 6 scan/s. The emission current was 50 mA, and the electron multiplier was set in relative mode to auto tune procedure. The maximum ionisation time was 25,000 ms, with an ionisation storage level of 35 m/z. The analysis was performed in FullScan mode. Compounds were identified by comparing their retention times with those of authentic compounds analysed under the same conditions, and by comparison

of the retention indices (as Kovats indices) with the literature data (Guedes de Pinho, Gonçalves et al., 2009). The comparison of MS fragmentation pattern with those of pure compounds and mass spectra database search was performed using the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS 05 spectral database, considering fit and retrofit values higher than 70%. For instance, the analysis of sesquiterpenes fragmentation was based on the fragmentation pattern of valencene, cloven and β -caryophyllene sesquiterpenes for which commercial standards are available. The identification was carried out by recognising the sesquiterpenes typical pattern including m/z ions at 105, 161, 189 and 204 and also the fit and retrofit percentage indicated in NIST05. Semi-quantification was achieved by peaks' areas determined with reconstructed FullScan chromatogram, using specific ions, for each compound, quantification ions (Tables 1 and 2). Using this method, some peaks which were co-eluted in FullScan mode (resolution value less than 1) could be integrated with a value of resolution higher than 1. All samples were analysed in triplicate. The results correspond to mean \pm standard deviation of three determinations, usually used for SPME analysis (Fernandes et al., 2009), and standard deviation values obtained are lower than 10% of the mean.

2.5. Statistical analysis

Principal component analysis (PCA) was carried out using XLSTAT 2009.6 software. The PCA method shows similarities be-

tween samples projected on a plane and makes it possible to identify which variables determine these similarities and in what way.

3. Results and discussion

In this work, 59 volatile and semi-volatile compounds were identified by HS-SPME/GC–IT–MS in five Portuguese varieties of *F. carica* leaves and fruits (peels and pulps), being distributed by distinct chemical classes: 14 aldehydes, eight alcohols, two ketones, six esters, seven monoterpenes, 18 sesquiterpenes, one norisoprenoid and three miscellaneous compounds (Fig. 1, Tables 1 and 2). As far as we know, this is the first report involving the above mentioned varieties and comparing the volatile composition of *F. carica* leaves, peels and pulps.

From the identified compounds, heptanal (42), benzaldehyde (44), 6-methyl-5-hepten-2-one (51), α -pinene (53), β -pinene (54), limonene (19), α -cubebene (21) linalool (56), α -ylangene (23), copaene (24), β -bourbonene (25), β -caryophyllene (28), β -elemene (26), (*E*)- α -bergamotene (58), alloaromadendrene (30), α -caryophyllene (31), germacrene D (33), τ -cadinene (36), methyl salicylate (18), and α -muurolene (37) were already reported in fruits and leaves of 20 *Ficus* species, including *F. carica* (Buttery et al., 1986; Grison, Edwards, & Hossaert-McKey, 1999; Grison-Pigé et al., 2002).

In general, all varieties showed a similar profile, although some differences were noticed (Tables 1 and 2 and Fig. 2). The highest diversity of compounds was found in leaves (40), followed by pulps (30) and peels (27). Leaves were the material with higher quantities of all classes of compounds, except for aldehydes and monoterpenes. These classes were found in highest amounts in peels and pulps (Tables 1 and 2).

Sesquiterpenes constituted the main class of compounds in *F. carica* leaves, except for “Verbera Preta” variety, in which psoralen is the compound in highest amounts (Table 1). Germacrene D, β -caryophyllene and τ -elemene were the major sesquiterpenes in leaves of all varieties. Germacrene D has been reported in fig leaves, being important for insect behaviour (Buttery et al., 1986). This compound is the main one in white varieties, and is considered to be a key intermediate in the biosynthesis of many sesquiterpenes, being known as an antimicrobial agent (Steliopoulos, Wüst, Adam, & Mosandl, 2002). In a general way, β -caryophyllene and τ -elemene were found in higher amounts in the leaves of the dark varieties. These two compounds are known to have antibacterial properties (Kim et al., 2008). Sesquiterpenes, such as β - and α -caryophyllene were released in response to the attack by *Spodoptera exigua* larvae in cotton plantlets. This seems to support the hypothesis of these compounds importance in the defence against insects (Loughrin, Manukian, Heath, Turlings, & Tumlinson, 1994).

Pulps and peels are characterised by lower amounts of sesquiterpenes when compared with leaves (Tables 1 and 2). τ -Cadinene (36) was only detected in peels. This seems to indicate that in fruits this compound is accumulated in the peels. (*E*)- α -bergamotene (58) was only detected in pulps of “Borrasota Tradicional” and “Verbera Preta” varieties, and could be used as chemical marker of these varieties.

Pulps and peels of all varieties exhibited higher levels of monoterpenes when compared to the leaves. In a general way, all materials presented limonene (19) and menthol (20) in highest amounts (Tables 1 and 2, Fig. 2). The insecticidal activity of limonene (Hebeish, Moustafa, Hamdy, EL-Sawy, & Abdel-Mohdy, 2008) and its strong antimicrobial activity, together with that of menthol (Skalik-Wozniak, Los, Glowinski, & Malm, 2009), can be used by the plant for its own protection. Previous studies demonstrated that limonene can be utilised in the prevention of several types of can-

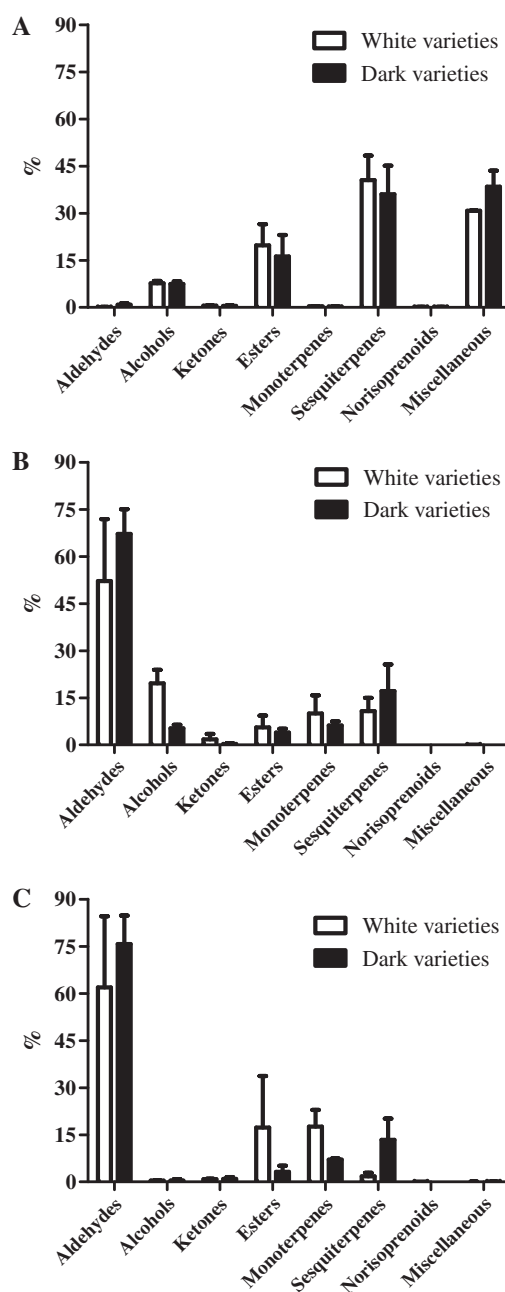


Fig. 2. Volatile profile (%) of white and dark varieties of *F. carica*. (A) Leaves, (B) peels and (C) pulps.

cer (Gray, 1993). Linalool (56) and epoxylinool (57) were present only in pulps, being found in major quantities in “Pingo de Mel” variety. The existence of higher contents of monoterpenes in the fruit may be related with their important role in the attraction of specific pollinators, namely in the fig/wasp relationship (Grison-Pigé et al., 2002).

Methyl salicylate is present in all analysed samples (Tables 1 and 2), being detected in higher amounts in the leaves (ca. 17% of total compounds identified). This compound is known to be essential in protecting local infections of plant against pathogens (Shah, 2009). Methyl salicylate is most likely an anti-herbivore defense (James & Price, 2004) and may also be used by plants as a pheromone, to warn other plants of pathogens, such as tobacco mosaic virus (Shulaev, Silverman, & Raskin, 1997). Other esters were common to the leaves of all varieties, such as hexyl acetate

(**16**) and ethyl benzoate (**17**) (Table 1). Methyl hexanoate (**15**) was found in all analysed peels and pulps (Table 2); on the other hand, ethyl salicylate (**52**) is only present in pulps (Table 2) and could be used as chemical marker of this material.

Volatile C₆ and C₉ aldehydes and alcohols are important contributors to the characteristic flavours of fruits, vegetables and green leaves (Schwab et al., 2008). Amongst all tested materials, the pulps showed the lowest amounts of alcohols and the leaves showed the highest content (Tables 1 and 2). Considering pulps, the presence of benzyl alcohol was only detected in white varieties (“Pingo de Mel” and “Branca Tradicional”) and phenylethyl alcohol in the “Preta Tradicional” variety. Benzyl alcohol was the major alcohol in leaves, whilst in peels 1-penten-3-ol and 2-nonen-1-ol were the alcohols present in higher amounts (Tables 1 and 2). The results indicate that the peels of the white varieties, produce higher levels of alcohols than the dark types (Fig. 2B).

Compounds derived from leucine, like 3-methyl-butanol, as well as phenylethyl alcohol formed from phenylalanine, are abundant in various fruits (Schwab et al., 2008). In addition, alcohols

and acids derived from amino acids can be esterified in others compounds, such as methyl butanoate (Schwab et al., 2008). This compound (**14**) was only detected in leaves of “Branca Tradicional” (Table 1), and could be used as chemical marker.

Aldehydes belong to an important class of volatiles that are indispensable to plants’ response to environmental conditions. Previous studies on these compounds have largely focused on C₆ aldehyde, a member of the green leaf volatiles. They are components of plant fragrance; they can be emitted after damage and are considered to be direct or indirect defence signals (Kishimoto, Matsui, Ozawa, & Takabayashi, 2005). In *F. carica* leaves five aldehydes (**1–5**) were found, with “Borrasota Tradicional” revealing the highest contents (ca. 1.8% of total compounds identified). 3-Methyl-butanol (**1**) and 2-methyl-butanol (**2**) were the major aldehydes in all varieties, with the exception of “Branca tradicional”, in which they were absent (Table 1).

Pulps had the highest number of aldehydes, where benzaldehyde was the major compound, except for “Borrasota Tradicional” and “Preta Tradicional” varieties, in which (*E*)-2-hexenal (**5**) was

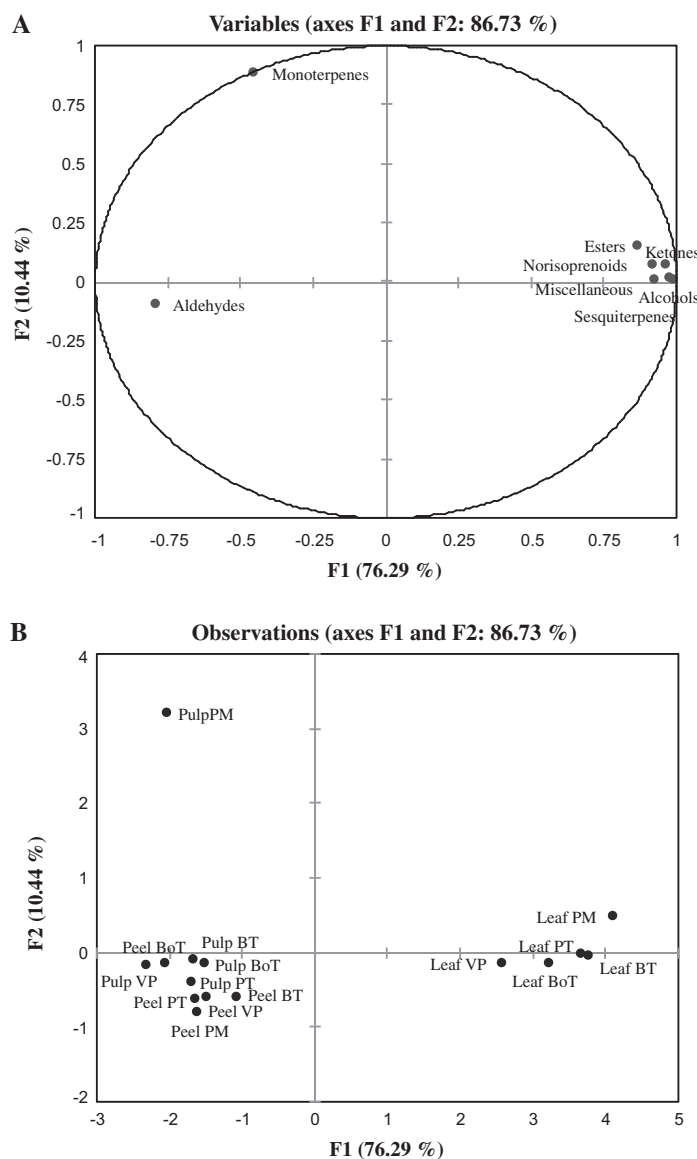


Fig. 3. PCA of all volatile compounds in *F. carica* analysed materials: projection of volatile compounds (variables: total of monoterpenes, aldehydes, alcohols, ketones, sesquiterpenes, esters, norisoprenoids and of miscellaneous compounds; PM, “Pingo de Mel”, BT, “Branca Tradicional”, BoT, “Borrasota Tradicional”, VP, “Verbera Preta” and PT, “Preta Tradicional”) into the plane composed by the principal axes F1 and F2 (86.7%).

the main compound (Table 2). Benzaldehyde is formed from benzyl alcohol, by oxidation catalysed by dehydrogenases (Dudareva, Pichersky, & Gershenzon, 2004). This has been successfully used to treat terminal human carcinomas and as antimicrobial agent (Choudhary, Chaudhari & Narkhede, 2003). (*E,E*)-2,4-Heptadienal (45) and nonanal (48) were only detected in peels and pulps, respectively (Table 2). Thus, it seems that they have a distinct distribution in the fruit and could be used as chemical marker of those vegetal tissues.

Ketones result from biosynthesis and/or degradation of fatty acids by β -oxidation (Schwab et al., 2008). 3-Pentanone (13) was the only ketone identified in all varieties of *F. carica* leaves, in similar amounts (0.6%), excepting “Verbera Preta”, which exhibited the lowest levels (0.3%) (Table 1). On the other hand, in pulps and peels, 6-methyl-5-hepten-2-one (51) was the only detected compound (Table 2). This compound is odour-active and known to be an oxidative byproduct or derived from carotenoids degradation (Goff & Klee, 2006). Carotenoids were previously reported in fruit of *F. carica* (Kakhniashvili, Kolesnik, Zharebin, & Golubev, 1986) and are known to provide important visual cues associated with fruit ripeness (Goff & Klee, 2006).

Considering norisoprenoids (Table 1), they are volatile C_9 – C_{13} fragments, resulting from the degradation of C_{40} carotenoids, which have extremely low aroma perception thresholds. They can be formed as a consequence of *in vivo* enzymatic degradation or postharvest thermal degradation of foods containing carotenoids. Depending on the carotenoid precursor and the breakdown position, different norisoprenoids can be obtained (Taveira et al., 2009). β -Cyclocitral (38) was the only norisoprenoid identified in leaves and pulps, being absent in the peels. This compound can be formed from oxidative cleavage of the double bond between carbons 7 and 8 of α -carotene and carbons 7' and 8' of β -cryptoxanthin (Mahattanatawee, Rouseff, Valim, & Naim, 2005) and is known to be insect repellent (Lamikanra, Richard, & Parker, 2002). Amongst all compounds determined in *F. carica* leaves varieties, β -cyclocitral was the minor one (Table 1).

Amongst miscellaneous compounds occurring in *F. carica* leaves, psoralen (40) is the main compound (ca. 34% of total compounds identified). It is the precursor of all types of furanocoumarins formed by dealkylation of (*S*)-(+)-marmesine by cytochrome P450-type enzymes (Miksch & Boland, 1996). Psoralen is a well known photodynamic active drug that is capable of absorbing radiant energy and responsible for contact dermatitis (Tava, Pecetti, Ricci, Pagnotta, & Russi, 2007).

Eugenol (59) was present only in pulps and peels and has several biological properties, namely antioxidant and antibacterial, and improves skin permeation of hydrophilic drugs (Taveira et al., 2009). It was the minor compound in all materials except in pulps of dark varieties (Table 2). Eugenol may be obtained via a pathway involving ferulic acid and vanillin, amongst others (Fernandes et al., 2009). A previous study has confirmed the presence of ferulic acid in *F. carica* (Oliveira et al., 2009).

To assess the variation of volatile composition of *F. carica* leaves and fruits, PCA was performed on obtained data. Fig. 3 shows the projection of chemical variables, grouped by chemical classes in all materials and in all varieties into the plane composed by the principal axes F1 and F2 containing 86.7% of the total variance. Leaves are projected into the plane formed by F1 positive axis due to their high concentration of all volatiles compounds, excepting monoterpenes and aldehydes. In contrast, pulps and peels are presented into the planes formed by F1 negative axis and F2 axis. “Pingo de Mel” pulp has a different position into the two planes, because this sample has higher amounts of monoterpenes, namely linalool and epoxylinalool. In order to get more information about the other samples, it was performed a new PCA analysis without “Pingo de Mel” pulp. Fig. 4 shows the projection of chemical vari-

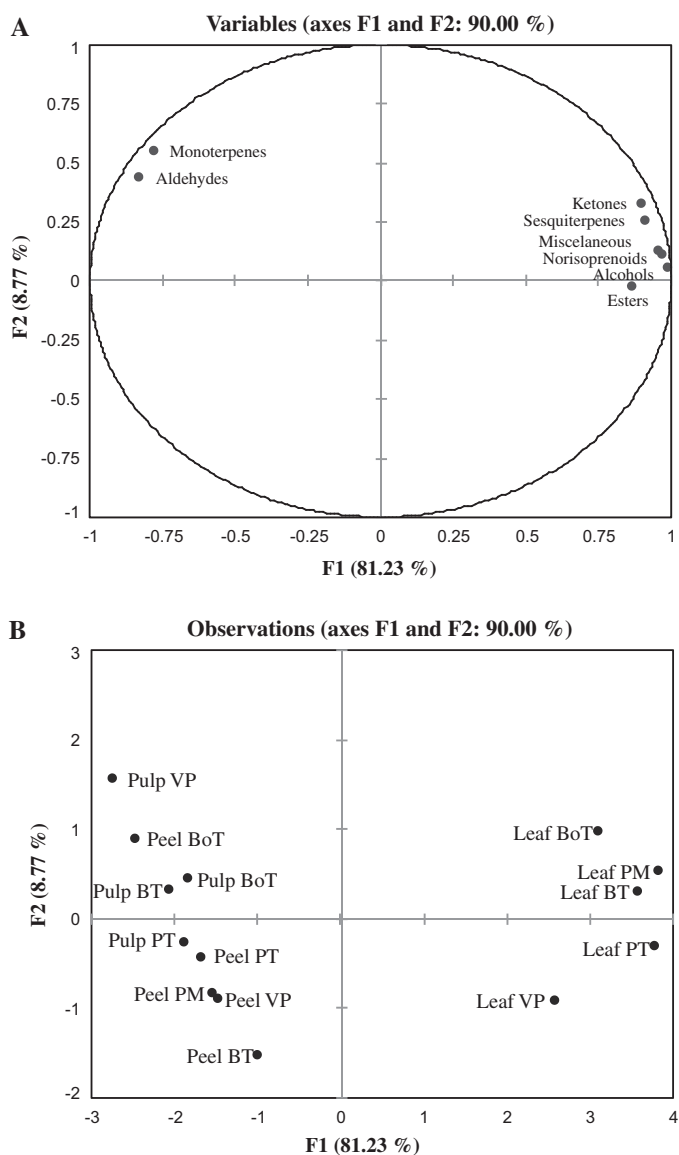


Fig. 4. PCA of all volatile compounds in *F. carica* analysed materials: projection of volatile compounds without pulp PM (variables: total of monoterpenes, aldehydes, alcohols, ketones, sesquiterpenes, esters, norisoprenoids and of miscellaneous compounds; PM, “Pingo de Mel”, BT, “Branca Tradicional”, BoT, “Borrasota Tradicional”, VP, “Verbera Preta” and PT, “Preta Tradicional”) into the plane composed by the principal axes F1 and F2 (90.0%).

ables, grouped by families (sum of compounds of each chemical class), in leaves, pulps and peels into the plane composed by the principal axis (F1 and F2) containing 90.0% of the total variance. These results confirmed that the others varieties presented similar volatile profiles and that pulps and peels are characterised by their monoterpenes and aldehydes levels. These classes of compounds allow distinguishing *F. carica* fruits from the leaves. The existence of higher contents of monoterpenes and aldehydes in fruits may be related with their important role in plant defences against herbivores and plant pathogens or as attractants for pollinators (Yamasaki, Kunoh, Yamamoto, & Akimitsu, 2007).

4. Conclusions

This is the first study comparing *F. carica* leaves, pulps and peels and has attempted to contribute to the knowledge of volatile properties of a fruit characteristic of the Mediterranean diet. A total of

59 volatile compounds were identified, belonging to several chemical classes, from which 39 are reported for the first time in the species. Generally, pulps and peels are distinguished from the leaves by the existence of higher amounts of aldehydes and monoterpenes. All varieties presented a similar volatile profile, although there were some differences between the white and dark types. In addition to the contribution for the organoleptic characteristics of *F. carica* materials, the presence of bioactive compounds, with health promotion properties, renders that the consumption of this species may provide protection against several diseases.

Acknowledgement

Andreia P. Oliveira (SFRH/BD/47620/2008) is indebted to FCT for the grant.

References

- Buttery, R. G., Flath, R. A., Mon, T. R., & Ling, L. C. (1986). Identification of germacrene D in walnut and fig leaf volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 820–822.
- Choudhary, V. R., Chaudhari, P. A., & Narkhede, V. S. (2003). Solvent-free liquid phase oxidation of benzyl alcohol to benzaldehyde by molecular oxygen using non-noble transition metal containing hydrotalcite-like solid catalysts. *Catalysis Communications*, 4, 171–175.
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, 135, 1893–1902.
- Fernandes, F., Guedes de Pinho, P., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Volatile constituents throughout *Brassica oleracea* L. var. acephala germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6795–6802.
- Gibernau, M., Buser, H. R., Frey, J. E., & Hossaert-McKey, M. (1997). Volatile compounds from extracts of figs of *Ficus carica*. *Phytochemistry*, 46, 241–244.
- Goff, S. A., & Klee, H. J. (2006). Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 311, 815–819.
- Gray, A. I. (1993). Quinoline alkaloids. In P. G. Waterman (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry* (pp. 271–308). London: Academic Press.
- Grisson, L., Edwards, A. A., & Hossaert-McKey, M. (1999). Interspecies variation in floral fragrances emitted by tropical *Ficus* species. *Phytochemistry*, 52, 1293–1299.
- Grisson-Pigé, L., Hossaert-McKey, M., Greeff, J. M., & Bessière, J.-M. (2002). Fig volatile compounds – A first comparative study. *Phytochemistry*, 61, 61–71.
- Guedes de Pinho, P., Ribeiro, B., Gonçalves, R. F., Baptista, P., Valentão, P., Seabra, R. M., et al. (2008). Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1704–1712.
- Guedes de Pinho, P., Pereira, D. M., Gonçalves, R. F., Valentão, P., Fernandes, F., Taveira, M., & Andrade, P. B. (2009). Headspace-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. In *Functional plant science and biotechnology* (pp.1–15). Middlesex: Global Science Books.
- Guedes de Pinho, P., Gonçalves, R. F., Valentão, P., Pereira, D. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., et al. (2009). Volatile composition of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 674–685.
- Hebeish, A., Moustafa, M. G. F., Hamdy, I. A., EL-Sawy, S. M., & Abdel-Mohdy, F. A. (2008). Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. *Carbohydrate Polymers*, 74, 268–273.
- James, D. G., & Price, T. S. (2004). Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1613–1628.
- Kakhniashvili, A., Kolesnik, A. A., Zhrebina, Y. L., & Golubev, V. N. (1986). Liposoluble pigments of the fruit of *Ficus carica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 22, 477–479.
- Kim, Y. S., Park, S. J., Lee, E. J., Cerbo, R. M., Lee, S. M., Ryu, C. H., et al. (2008). Antibacterial compounds from rose bengal-sensitized photooxidation of β -caryophyllene. *Journal of Food Science*, 73, 540–545.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R., & Takabayashi, J. (2005). Volatile C6-aldehydes and allo-ocimene activate defense genes and induce resistance against *Botrytis Orlova* I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., cinerea in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46, 1093–1102.
- Lamikanra, O., Richard, O. A., & Parker, A. (2002). Ultraviolet induced stress response in fresh cut cantaloupe. *Phytochemistry*, 60, 27–32.
- Loughrin, J. H., Manukian, A., Heath, R. R., Turlings, T. C. J., & Tumlinson, J. H. (1994). Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivore-injured cotton plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 11836–11840.
- Mahattanatawee, K., Rouseff, R., Valim, M. F., & Naim, M. (2005). Identification and aroma impact of norisoprenoids in orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 393–397.
- Miksch, M., & Boland, W. (1996). Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plants (*Apium graveolens*). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 52, 739–743.
- Oliveira, A. P., Valentão, P., Pereira, J. A., Silva, B. M., Tavares, F., & Andrade, P. B. (2009). *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2841–2846.
- Ong, B. T., Nazimah, S. A. H., Tan, C. P., Mirhosseini, H., Osman, A., Mat Hashim, D., et al. (2008). Analysis of volatile compounds in five jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) cultivars using solid-phase microextraction (SPME) and gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOFMS). *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 416–422.
- Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 270–278.
- Riu-Aumatell, M., Castellari, M., López-Tamames, E., Galassi, S., & Buxaderas, S. (2004). Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chemistry*, 87, 627–637.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., & Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavour compounds. *Plant Journal*, 54, 712–732.
- Shah, J. (2009). Plants under attack: Systemic signals in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 459–464.
- Shulaev, V., Silverman, P., & Raskin, I. (1997). Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, 385, 718–721.
- Skalika-Wozniak, K., Los, R., Glowinski, K., & Malm, A. (2009). Volatile compounds in fruits of *Peucedanum cervaria* (LAP.) L. *Chemistry and Biodiversity*, 6, 1087–1092.
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergman, M., Gottlieb, H., et al. (2006). Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7717–7723.
- Steliopoulos, P., Wüst, M., Adam, K.-P., & Mosandl, A. (2002). Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ^{13}C and ^2H labeling studies. *Phytochemistry*, 60, 13–20.
- Tava, A., Pecetti, L., Ricci, M., Pagnotta, M. A., & Russi, L. (2007). Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. *Flavour Fragrances Journal*, 22, 363–370.
- Taveira, M., Guedes de Pinho, P., Gonçalves, R. F., Andrade, P. B., & Valentão, P. (2009). Determination of eighty-one volatile organic compounds in dietary *Rumex induratus* leaves by GC/IT-MS, using different extractive techniques. *Microchemical Journal*, 93, 67–72.
- Yamasaki, Y., Kunoh, H., Yamamoto, H., & Akimitsu, K. (2007). Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 168–179.

5.4. Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* latex

J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 3393-3398

Chemical Assessment and *in Vitro* Antioxidant Capacity of *Ficus carica* Latex

ANDREIA P. OLIVEIRA,[†] LUÍS R. SILVA,[†] FEDERICO FERRERES,[‡] PAULA GUEDES DE PINHO,^{*,§}
 PATRÍCIA VALENTÃO,[†] BRANCA M. SILVA,^{†,||} JOSÉ A. PEREIRA,[⊥] and PAULA B. ANDRADE^{*,†}

[†]REQUIMTE/Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal, [‡]Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, CEBAS (CSIC) P.O. Box 164, 30100 Campus University Espinardo, Murcia, Spain, [§]REQUIMTE/Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Porto University, R. Aníbal Cunha, 164, 4050-047 Porto, Portugal, ^{||}CEBIMED/Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, R. Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal, and [⊥]CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal

Ficus species possess latex-like material within their vasculatures, affording protection and self-healing from physical attacks. In this work, metabolite profiling was performed on *Ficus carica* latex. Volatiles profile was determined by HS-SPME/GC–IT-MS, with 34 compounds being identified, distributed by distinct chemical classes: 5 aldehydes, 7 alcohols, 1 ketone, 9 monoterpenes, 9 sesquiterpenes and 3 other compounds. Sesquiterpenes constituted the most abundant class in latex (ca. 91% of total identified compounds). Organic acids composition was also characterized, by HPLC–UV, and oxalic, citric, malic, quinic, shikimic and fumaric acids were determined. Malic and shikimic acids were present in higher amounts (ca. 26%, each). The antioxidant potential of this material was checked by distinct *in vitro* chemical assays. A concentration-dependent activity was noticed against DPPH, nitric oxide and superoxide radicals. Additionally, acetylcholinesterase inhibitory capacity was evaluated, but a weak effect was found.

KEYWORDS: *Ficus carica* latex; volatiles; organic acids; antioxidant potential; acetylcholinesterase inhibition

INTRODUCTION

Latex is widely distributed in plants and consists of cytoplasmatic fluid of laticiferous tissues that contain the usual organelles of plant cells, such as nucleus, mitochondria, vacuoles and ribosomes, among others (1). This material contains various secondary metabolites, like terpenoids and phenolics, and proteins, namely, cysteine proteases (2, 3). Many of these compounds provide resistance to herbivores via toxic or antinutritive effects, whereas others are involved in the stickiness that can mire insect herbivores (2).

Ficus carica L., the common fig, is a species of great commercial importance, comprising numerous varieties with significant genetic diversity. All *Ficus* species possess latex-like material within their vasculatures. *F. carica* latex has been traditionally used in the treatment of gout, ulcers and warts, among other situations (4, 5), given its proteolytic and keratolytic effects, associated with its viscosity (6).

Plants show a constitutive emission of volatile compounds that are released from the surface of the leaf and/or accumulated in storage sites. Terpenes, as the largest class of plant secondary metabolites (7), have many volatile representatives. Monoterpenes (C₁₀), sesquiterpenes (C₁₅), and even some diterpenes (C₂₀), have high enough vapor pressures at normal atmospheric conditions to

allow significant release into the air (8). These compounds play different roles in herbivore elimination, either by attraction of parasitoids that increase herbivore mortality (indirect defense) or by directly reducing herbivores (7).

Organic acids are primary metabolites, which can be found in great amounts in all plants, especially in the fruits. The type and content of organic acids found are extremely variable between species, developmental stages and tissues types, additionally playing an important role in pH regulation (9). These compounds also exert a protective role against various diseases, due to their antioxidant activity (10).

Antioxidant compounds, such as phenolics, organic acids, vitamin E and carotenoids, protect against oxidation, or cellular damage caused by reactive species, preventing the initiation of several diseases, like many types of cancer, heart disease, diabetes and neurodegenerative illnesses (11). Antioxidant activities have also been observed for volatile compounds, which are found in many plants, as well as in foods and beverages (12).

Recently, several studies have been developed to assess the ability of natural compounds for inhibiting acetylcholinesterase activity, since this is the first approach for the treatment of neurological disorders, such as Alzheimer's disease, senile dementia and ataxia (13).

Few studies have been reported in *F. carica* latex, to describe the presence of 6-*O*-acyl- β -D-glucosyl- β -sitosterols and their

*Corresponding authors. Tel: +351 222078934. Fax: +351 222003977.
 E-mail: pandrade@ff.up.pt (P.B.A.), pguedes@ff.up.pt (P.G.P.).

capacity to inhibit the proliferation of some human cancer cells (4, 14, 15), the characterization of ficin, a cysteine proteinase (3), antifungal and anthelmintic activities (16, 17), as well as the characterization of protein genes (1). As far as we know, no study concerned the volatiles and organic acids composition of *F. carica* latex, or its antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential.

This work aimed to contribute to the knowledge of the metabolic profile of *F. carica* latex and to evaluate some of its biological capacities. Volatile compounds and organic acids profiles were characterized, and antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory capacities were checked.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Reagents. All chemicals used were of analytical grade. The standards compounds were purchased from various suppliers: pentanal, heptanal, octanal, 1-butanol-3-methyl, 1-butanol-2-methyl, 1-pentanol, 1-heptanol, 6-methyl-5-hepten-2-one, limonene, terpinolene, *cis*-linalool oxide, linalool, cadinene, methyl salicylate, quinoline and psoralene were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); hexanal, benzaldehyde, phenylethyl alcohol, phenylpropyl alcohol were from SAFC (Steinheim, Germany); α -pinene, β -pinene and eucalyptol were from Extrasynthèse (Genay, France), and 1-hexanol was from Fluka (Buchs, Switzerland). Sodium nitroprussiate dihydrate was purchased from Riedel-de Haën (St. Louis, MO). *N*-(1-Naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride, phosphoric acid and methanol were from Merck. Sulfanilamide, β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitroblue tetrazolium chloride (NBT), phenazine methosulfate (PMS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]), acetylthiocholine iodide and acetylcholinesterase (from electric eel, type VI-s) were obtained from Sigma-Aldrich. The water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA).

Latex Sample. Immature green fruits from *F. carica* cultivar Pingo de Mel trees growing in Mirandela region (Northeast Portugal) were harvested in June of 2009. Latex was collected manually without using steel knives, by incising the stalk of the green fruit from the main branch. The sample was obtained drop-by-drop without squeezing, homogenized, weighted, separated by aliquots and kept at -20°C until processed.

Volatile Compounds. *SPME Fibers.* Several commercial fibers can be used to extract volatiles. According to bibliography, recommendations of supplier (Supelco, Bellefonte, PA) and our own knowledge (18), the fiber used was coated with divinylbenzene/polydimethylsiloxane (DVB/PDMS), 65 μm .

Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME). *F. carica* latex was kept at 40°C , for 5 min, to promote compounds' release. This was done without agitation because the sample had previously corroded the stirrer. The fiber was then exposed to the headspace for 60 min, at 40°C . Afterward the fiber was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and inserted into the injection port of the GC system for thermal desorption, for 1 min. The fiber was then removed and conditioned in another GC injection port for 15 min at 250°C .

Gas Chromatography–Ion Trap Mass Spectrometry Analysis (GC–IT-MS). HS-SPME analysis was performed with a Varian CP-3800 gas chromatograph (USA) coupled to a VARIAN Saturn 4000 mass selective detector (USA) and a Saturn GC/MS workstation software version 6.8. A VF-5 ms $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ (FactorFour) column from VARIAN was used in the analysis. The injector port was heated to 220°C , and injections were performed in splitless mode. The carrier gas was helium C-60 (Gasin, Portugal), at a constant flow of 1 mL/min. Oven temperature was set at 40°C (for 1 min), then increasing $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 220°C and held for 30 min. All mass spectra were acquired in electron impact (EI) mode. Ionization was maintained off during the first minute. Transfer line, manifold and trap temperatures of the ion trap detector were set at 280, 50, and 180°C , respectively. As a preliminary analysis of the matrix revealed the presence of low molecular weight compounds (below 350 m/z), in order to increase the method's sensibility covered mass ranged from 40 to 350 m/z , with a scan rate of 6 scan/s. The emission current was 50 mA, and the electron multiplier was set in relative mode to auto tune procedure. The maximum ionization time was 25,000 ms, with an ionization storage level of 35 m/z . The analysis was performed in Full Scan mode. Compounds were identified by comparing their retention times with those of authentic reference compounds analyzed

under the same conditions, and by comparison of the retention indices (as Kovats indices) with literature data (18). The comparison of MS fragmentation pattern with those of pure compounds and mass spectrum database search was performed using the National Institute of Standards and Technology (NIST 05) MS spectral database. Confirmation was also accomplished using laboratory built MS spectral database, obtained from chromatographic runs of pure compounds performed with the same equipment and conditions. Peaks' areas were determined by reconstructed Full Scan chromatogram using for each compound some specific ions, quantification ions (Table 1). By this way some peaks which were coeluted in Full Scan mode (resolution value less than 1) could be integrated with a value of resolution higher than 1. Each sample was analyzed in triplicate.

HPLC/UV for Organic Acids Analysis. The preparation of the sample consisted in the acidification of 5 mL of latex with 5 mL of H_2SO_4 0.01 N, followed by filtration. Twenty microliters of the acidified sample was analyzed on an analytical HPLC unit (Gilson), using an ion exclusion column Nucleogel Ion 300 OA ($300 \times 7.7\text{ mm}$), in conjunction with a column heating device set at 30°C . Elution (70 min) was carried out at a solvent flow rate of 0.2 mL/min, isocratically, with sulfuric acid 0.01 N as the mobile phase. Detection was performed with a Gilson UV detector at 214 nm. The organic acids quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards.

Antioxidant Activity. *DPPH[•] Assay.* Antiradical activity was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo Electron Corporation), by monitoring the disappearance of DPPH[•] at 515 nm, according to a described procedure with some modifications (10). Latex was diluted with methanol and centrifuged at 13,000 rpm for 2 min (Biofuge Fresco, Heraeus). The reaction mixtures in the sample wells consisted of 25 μL of supernatant and 200 μL of 150 μM DPPH[•] dissolved in methanol. The plate was incubated for 30 min at room temperature after the addition of DPPH[•]. Three experiments were performed in triplicate.

Nitric Oxide Radical Assay. Antiradical activity was determined in an Multiskan Ascent plate reader (Thermo Electron Corporation), according to a described procedure (10) with some modifications. Briefly, 100 μL of sodium nitroprusside 20 mM were incubated with 100 μL of sample for 60 min, at room temperature, under light. After this period Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamine, in 2% phosphoric acid) was added and the mixture was incubated at room temperature for 10 min, with centrifugation at 4,000 rpm (Eppendorf centrifuge 5810R) during 5 min. The absorbance of the supernatant was read at 562 nm. Three experiments were performed in triplicate.

Superoxide Radical Assay. Superoxide radicals were generated by NADH/PMS system according to a described procedure (10). All components were dissolved in 19 mM phosphate buffer (pH 7.4). In each well, sample, NADH and NBT were added. The reaction was initiated by the addition of PMS and conducted at 560 nm, at room temperature for 2 min. Three experiments were performed in triplicate.

Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. The effect on acetylcholinesterase activity was determined spectrophotometrically in a Multiskan Ascent plate reader (Thermo Electron Corporation) based on Ellman's method, according to a described procedure (10). The following buffers were used: buffer A, 50 mM Tris-HCl, pH 8; buffer B, 50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 0.1% bovine serum albumin (BSA); buffer C, 50 mM Tris-HCl, pH 8, containing 0.1 M NaCl and 0.02 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

In each well the mixture consisted of acetylthiocholine in water, DTNB in buffer C, buffer B, sample dissolved in a solution of 10% methanol in buffer A and acetylcholinesterase. The absorbance was measured at 405 nm before and after enzyme addition. The rates of reactions were calculated by Ascent Software version 2.6 (Thermo Labsystems Oy). The rate of the reaction before adding the enzyme was subtracted from that obtained after enzyme addition, in order to correct eventual spontaneous hydrolysis of substrate. Percentage of inhibition was calculated by comparing the rates of the sample with the control (10% methanol in buffer A). Three experiments were performed in triplicate.

RESULTS AND DISCUSSION

Volatile Compounds. The results obtained by HS-SPME/GC–IT-MS with *F. carica* latex are displayed in Table 1. As far as we know, this is the first study describing the volatile profile of *F. carica* latex.

Table 1. Volatile Composition of *F. carica* Latex

no.	compound	RI ^a	ID ^b	QI ^c (m/z)	area ^d /1000 (SD)
Aldehydes					
1	pentanal	784	S, MS (74.3/87.8)	44/58/81	0.28 (0.1)
2	hexanal	891	S, MS (86.9/87.8)	56/57/67/72	3.56 (0.28)
3	heptanal	991	S, MS (78.1/80.1)	55/57/70	0.44 (0.09)
4	benzaldehyde	1057	S, MS (81.6/83.2)	77/105	33.67 (1.21)
5	octanal	1094	S, MS (79.8/90.9)	67/81/95	1.43 (0.16)
total of aldehydes					39.38
Alcohols					
6	1-butanol-3-methyl	825	S, MS (81.7/85.7)	56/71	0.11 (0.01)
7	1-butanol-2-methyl	829	S, MS (82.0/89.6)	56/70	0.52 (0.07)
8	1-pentanol	859	S, MS (86.6/90.6)	55/70	2.01 (0.17)
9	1-hexanol	950	S, MS (78.8/80.1)	56/69	58.49 (0.57)
10	1-heptanol	1063	S, MS (82.8/83.3)	55/70/83	64.24 (0.21)
11	phenylethyl alcohol	1203	S, MS (86.5/91.3)	91/122	5.45 (0.11)
12	phenylpropyl alcohol	1312	S, MS (88.7/92.6)	91/117/136	3.81 (0.10)
total of alcohols					134.63
Ketones					
13	6-methyl-5-hepten-2-one	1077	S, MS (86.5/85.8)	67/108	0.56 (0.09)
total of ketones					0.56
Monoterpenes					
14	α -thujene	1016	MS (85.3/89.6)	77/93/136	2.05 (0.83)
15	α -pinene	1024	S, MS (88.5/89.6)	92/93/136	1.76 (0.18)
16	β -pinene	1079	S, MS (86.5/85.8)	93/121	22.18 (0.70)
17	limonene	1119	S, MS (73.4/81.0)	68/93	17.70 (2.00)
18	eucalyptol	1123	S, MS (78.4/83.6)	81/93/108	0.33 (0.01)
19	terpinolene	1175	S, MS (88.4/90.8)	93/121	1.93 (0.02)
20	<i>cis</i> -linalool oxide	1177	S, MS (80.3/86.2)	59/68/94	2.95 (0.06)
21	linalool	1191	S, MS (84.0/84.0)	136	46.93 (1.6)
22	epoxylinolol	1266	MS (83.5/84.2)	68/94	3.06 (0.29)
total of monoterpenes					98.89
Sesquiterpenes					
23	α -guaiane	1375	MS (81.7/83.6)	95/147	1.17 (0.07)
24	α -bourbonene	1388	MS (80.1/80.7)	81/123/161	61.31 (1.13)
25	β -caryophyllene	1408	S, MS (87.5/87.6)	161/189/204	45.46 (3.22)
26	<i>trans</i> - α -bergamotene	1420	MS (72.2/72.6)	93/119/204	38.54 (0.46)
27	α -caryophyllene	1446	MS (75.9/76.4)	80/93/121	57.57 (1.74)
28	τ -muurolene	1467	MS (77.7/78.6)	105/161/204	203.87 (1.01)
29	germacrene D	1469	MS (84.5/88.8)	105/119/161	2698.50 (94.05)
30	cadinene	1507	S, MS (74.0/74.3)	105/119/161	281.85 (11.82)
31	α -calacorene	1532	MS (81.7/94.5)	142/157/200	7.37 (0.48)
total of sesquiterpenes					3395.64
Miscellaneous Compounds					
32	methyl salicylate	1284	S, MS (86.4/90.4)	92/120/152	27.51 (0.31)
33	quinoline	1317	S, MS (91.6/93.0)	102/129	7.89 (0.23)
34	psoralene	1847	S, MS (88.0/93.8)	156/188	11.17 (0.92)

^a RI = retention index. ^b ID = Identification method (fit/retrofit values, %). S = identified by comparison with reference compounds, MS = tentatively identified by NIST05. ^c QI = quantification ions. ^d Area expressed as arbitrary units.

From the identified compounds, heptanal (**3**), benzaldehyde (**4**), 1-hexanol (**9**), phenylpropyl alcohol (**12**), 6-methyl-5-hepten-2-one (**13**), α -thujene (**14**), α -pinene (**15**), β -pinene (**16**), limonene (**17**), terpinolene (**19**), *cis*-linalool oxide (**20**), linalool (**21**), α -bourbonene (**24**), β -caryophyllene (**25**), *trans*- α -bergamotene (**26**), α -caryophyllene (**27**), germacrene D (**29**), cadinene (**30**), methyl salicylate (**32**) and psoralene (**34**) were already reported in fruits and leaves of twenty *Ficus* species, including *F. carica* (19–21). According to the work of Grison-Pigé et al. (21), which described the occurrence of 99 volatile compounds in fruits of *Ficus* species, the most abundant ones were terpenoids (monoterpenes and

sesquiterpenes), aliphatic compounds, like 1-hexanol and heptanal, and products from the shikimic acid pathway, as benzaldehyde.

The major class of identified compounds in *F. carica* latex was that of sesquiterpenes (ca. 91% of identified compounds), followed by alcohols (ca. 4%). Ketones represented the minor components (<0.1%) (Table 1).

The short-chain aldehydes and alcohols are produced by plants in response to wounding and play an important role in the plant's defense strategies, pest resistance and protective effect against microbial proliferation (7). The presence of these types of

compounds in latex is not surprising considering that this material is produced for plant defense (2).

Among the five aldehydes detected, benzaldehyde was the major one in the sample (Table 1). This compound is formed from benzyl alcohol, by oxidation catalyzed by dehydrogenases (8). This is an important intermediate for perfumery, pharmaceutical, dyestuff and agrochemical industries (23). In addition, benzaldehyde has been successfully used to treat terminal human carcinomas and as antimicrobial agent (24).

Regarding alcohols, 1-hexanol (9) and 1-heptanol (10) were the ones in highest amounts (Table 1). Compounds derived from leucine, such as 3-methylbutanol (6), as well as phenylethyl alcohol (11) formed from phenylalanine, are abundant in various fruits, like strawberry, tomato and grape varieties (22). Although phenylethyl alcohol is present in low amounts in latex, it has long been known to possess antimicrobial properties and to act as a potent insect attractant (18).

6-Methyl-5-hepten-2-one (13) was the only ketone identified in latex (Table 1). This compound is odor-active and known to be an oxidative byproduct or derived from carotenoids degradation (25). Carotenoids were previously reported in fruit of *F. carica* (26) and are known to provide important visual cues associated with fruit ripeness (25).

As referred to above, sesquiterpenes constituted the main class of compounds identified in *F. carica* latex (Table 1). Among sesquiterpenes, germacrene D (29) was the more abundant one, followed by cadinene (30) and τ -muurolene (28). Germacrene D has been reported in fig leaves, and it can be important to insect behavior (19). This compound is considered to be a key intermediate in the biosynthesis of many sesquiterpenes and is known as an antimicrobial agent (27). τ -Muurolene and cadinene have antifungal properties (28).

Linalool (21) was the main identified monoterpene in *F. carica* latex. Grison et al. (20) reported that with respect to volatiles in *F. carica* fruits, the synthetic mixture of linalool, benzyl alcohol and linalool oxides was essential for the attraction of the pollinating wasp. Linalool is used as a scent in perfumed hygiene products, being also applied for its known antimicrobial properties (29). Other important monoterpenes, α -pinene (15), β -pinene (16) and limonene (17), exhibit strong antimicrobial activity too (29). Previous studies demonstrated that limonene can be utilized in the prevention of several types of cancer (29).

Among other miscellaneous compounds occurring in *F. carica* latex, methyl salicylate (33) (Table 1) is known to be essential in protecting local infections of plant against pathogens (30). *S*-Adenosyl-L-methionine-salicylic acid carboxyl methyltransferase catalyzes the formation of methyl salicylate from salicylic acid, a known anti-inflammatory and analgesic compound (22, 25). Methyl salicylate is a common component of floral scent and is believed to be an important attractant of insect pollinators (8, 22).

Quinoline (33), also determined in the analyzed sample (Table 1), is an alkaloid biosynthetically derived from anthranilic (2-aminobenzoic) acid (31). This compound is used as antimicrobial agent (3).

Psoralene (34) is the precursor of all types of furanocoumarins formed by dealkylation of (*S*)-(+)-marmesine by cytochrome P450-type enzymes (32). This compound has already been reported in *F. carica* leaves and fruits (10). Psoralene is a well-known photodynamic active drug that is capable of absorbing radiant energy and responsible for contact dermatitis (33).

Organic Acids. Organic acids profile of *F. carica* latex revealed to be composed by six organic acids: oxalic, citric, malic, quinic, shikimic and fumaric acids (Table 2). These compounds were already reported in *F. carica* aqueous lyophilized extracts of leaves, pulps and peels (10), but it is the first time that they are

Table 2. Organic Acids Composition of *F. carica* Latex (mg/kg)^a

organic acids	retention time (min)	latex
oxalic	20.16	379.6 \pm 8.4
citric	30.14	309.7 \pm 5.6
malic	36.63	808.4 \pm 144.3
quinic	38.38	751.1 \pm 111.4
shikimic	47.31	817.5 \pm 21.8
fumaric	60.74	106.1 \pm 36.0
total		3172.3

^a Values are expressed as mean \pm standard deviation of three assays.

described in its latex. Malic and shikimic were the most abundant acids, each representing ca. 26% of total organic acids content, followed by quinic acid (ca. 24%), while fumaric acid was a minor compound (ca. 3%) (Table 2).

Organic acids influence the organoleptic characteristics of fruits and vegetables, namely, flavor, and contribute to their acidity (9). In fact, the analyzed latex exhibited a pH of 5, which can be related, at least partially, to the presence of organic acids.

Antioxidant Capacity. In the present work, the antioxidant ability of *F. carica* latex was screened by DPPH assay, which allowed observation of a concentration-dependent potential ($IC_{25} = 1049 \mu\text{g/mL}$) (Figure 1A).

Superoxide radical is one of the most effective free radicals, implicated in cell damage as precursor of important reactive oxygen species, like hydroxyl radical and peroxynitrite, contributing to the pathological process of many diseases (34). The analyzed sample presented a protective effect against superoxide radical, in a concentration-dependent way, with an IC_{25} at $291 \mu\text{g/mL}$ (Figure 1B).

Nitric oxide is involved in several physiological processes, like blood pressure control, neural signal transduction, platelet function and antimicrobial defense (34). Despite the beneficial effects, an overproduction of this reactive species is associated with several types of biological damage (35). In addition, it reacts rapidly with superoxide radical to form peroxynitrite, a major damaging oxidant produced *in vivo* (35). *F. carica* latex displayed nitric oxide scavenging capacity, which was concentration-dependent ($IC_{25} = 1768 \mu\text{g/mL}$) (Figure 1C).

Under the assay conditions, when comparing with aqueous lyophilized extracts of other *F. carica* materials, namely, leaves, pulps and peels (10), it is possible to see that latex possesses a stronger antioxidant capacity than fruits, although leaves are the most effective material. As far as we know, this is the first study assessing the antioxidant activity of this latex.

Overall, the results obtained in the three assays revealed latex good ability to scavenge free radicals, which can be partially related to the presence of organic acids (10). In addition, this antioxidant activity may also be attributed to the presence of several volatile compounds known for their antioxidant properties, such as limonene, α -pinene, β -pinene, terpinolene and sesquiterpenes (36). Based on the scavenging capacity observed for both superoxide radical and nitric oxide, latex may also prevent the formation of other biologically important oxidative species resultant from the reaction of those two, like peroxynitrite and hydroxyl radical. However, the existence in latex of other nondetermined compounds, with antioxidant capacity, cannot be ignored.

Acetylcholinesterase Inhibitory Activity. Several studies indicate a considerable increase in the prevalence of Alzheimer disease over the next two decades. Most treatment strategies have been based on the cholinergic hypothesis, which postulates that memory impairments in patients suffering from this disease result from a deficit of cholinergic function in brain. One of the most

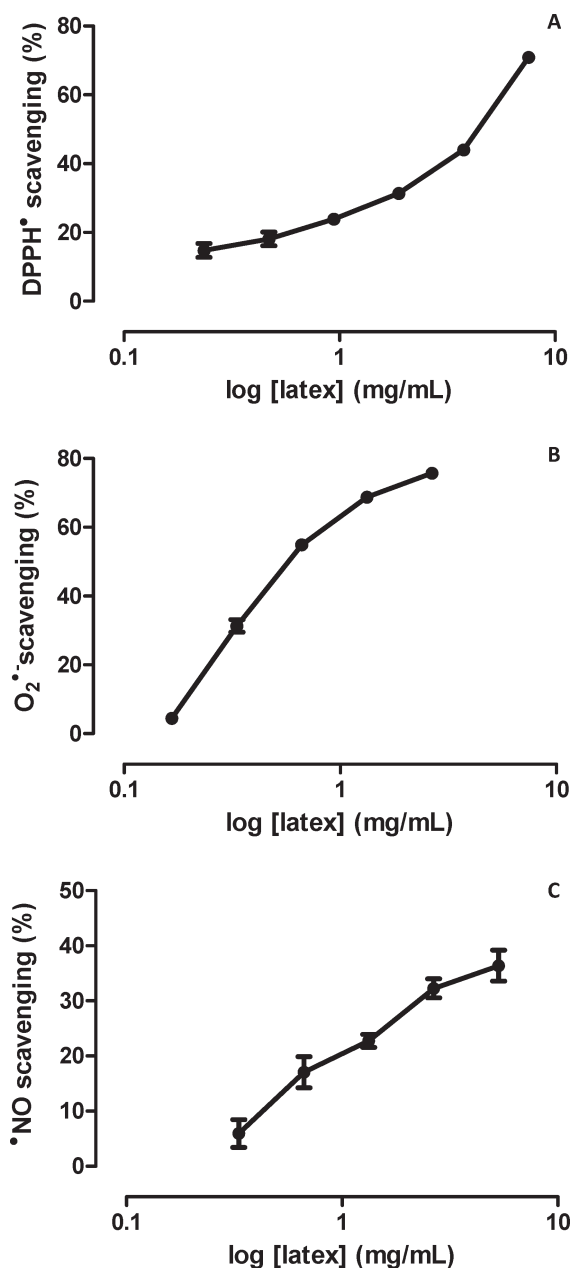


Figure 1. Effect of *F. carica* latex against (A) DPPH[•], (B) superoxide radical (O₂^{•-}) and (C) nitric oxide (*NO). Values show mean ± SE of three experiments performed in triplicate.

promising treatment approaches is to enhance the acetylcholine level in the brain using acetylcholinesterase inhibitors (37).

As far as we know, the effects of *F. carica* latex on enzyme activity were assessed for the first time. Latex exhibited low acetylcholinesterase inhibitory capacity: under the assay conditions, and for the highest tested concentration (5317 μg/mL), the effect corresponded to less than 10%. However, latex has more acetylcholinesterase inhibitory capacity comparing to leaves, pulps and peels, since these materials had no effect against this enzyme (10).

In conclusion, to our knowledge *F. carica* latex volatile profile was achieved for the first time and thirty-four volatile compounds were determined. As far as we know, this is also the first study describing the organic acids composition of this matrix and its antioxidant activity. The volatile and organic acids qualitative profiles of *F. carica* latex are similar to those of other *F. carica* materials, namely, leaves, peels and pulps, although

some differences at quantitative levels were noticed (10, 21). In addition, and as discussed above, the biological capacity of all materials is different (10, 21). One should have in mind that latex also contains other components besides those determined herein. All these facts suggest that the biological activity of a given matrix is clearly conditioned by its metabolic profile, as observed before with other natural products (34, 38, 39).

The results obtained are very promising, constituting a base for the possible application of this matrix in food, cosmetic and pharmaceutical industries, due to its antioxidant capacity. However, precautions regarding the direct application of latex are needed, because, as mentioned above, this material presents keratolytic and corrosive properties.

LITERATURE CITED

- (1) Kim, J. S.; Kim, Y. O.; Ryu, H. J.; Kwak, Y. S.; Lee, J. Y.; Kang, H. Isolation of stress-related genes of rubber particles and latex in fig tree (*Ficus carica*) and their expressions by abiotic stress or plant hormone treatments. *Plant Cell Physiol.* **2003**, *44*, 412–419.
- (2) Agrawal, A. A.; Konno, K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2009**, *40*, 311–331.
- (3) Konno, K.; Hirayama, C.; Nakamura, M.; Tateishi, K.; Tamura, Y.; Hattori, M.; Kohno, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* **2004**, *37*, 370–378.
- (4) Lansky, E. P.; Paavilainen, H. M.; Pawlus, A. D.; Newman, R. A. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 195–213.
- (5) Bohlooli, S.; Mohebipoor, A.; Mohammadi, S.; Kouhnavard, M.; Pashapoor, S. Comparative study of fig tree efficacy in the treatment of common warts (*Verruca vulgaris*) vs. cryotherapy. *Int. J. Dermatol.* **2007**, *46*, 524–526.
- (6) Hemmatzadeh, F.; Fatemi, A.; Amini, F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. *J. Vet. Med. B* **2003**, *50*, 473–476.
- (7) Guedes de Pinho, P.; Pereira, D. M.; Gonçalves, R. F.; Valentão, P.; Fernandes, F.; Taveira, M.; Andrade, P. B. Headspace-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. In *Functional Plant Science and Biotechnology*; Global Science Books: 2009; Vol. 3, pp 1–15.
- (8) Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1893–1902.
- (9) Sweetman, C.; Deluc, L. G.; Cramer, G. R.; Ford, C. M.; Soole, K. L. Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1329–1344.
- (10) Oliveira, A. P.; Valentão, P.; Pereira, J. A.; Silva, B. M.; Tavares, F.; Andrade, P. B. *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 2841–2846.
- (11) García-Alonso, M.; Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* **2004**, *84*, 13–18.
- (12) Wei, A.; Mura, K.; Shibamoto, T. Antioxidative activity of volatile chemicals extracted from beer. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4097–4101.
- (13) Mukherjee, P. K.; Kumar, V.; Mal, M.; Houghton, P. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* **2007**, *14*, 289–300.
- (14) Rubnov, S.; Kashman, Y.; Rabinowitz, R.; Schlesinger, M.; Mechoulam, R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 993–996.
- (15) Wang, J.; Wang, X.; Jiang, S.; Lin, P.; Zhang, J.; Lu, Y.; Wang, Q.; Xiong, Z.; Wu, Y.; Ren, J.; Yang, H. Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1025–1033.
- (16) Mavlonov, G. T.; Ubaidullaeva, K. A.; Rakhmanov, M.; Abdurakhmonov, I. Y.; Abduraimov, A. Chitin-binding antifungal protein from *Ficus carica* latex. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 216–219.

- (17) Amorin, A.; Borba, H. R.; Carauta, J. P. P.; Lopes, D.; Kaplan, M. A. C. Antihelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 255–258.
- (18) Guedes de Pinho, P.; Gonçalves, R. F.; Valentão, P.; Pereira, D. M.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B.; Sottomayor, M. Volatile composition of *Catharantus roseus* (L.) G. Don using solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49*, 674–685.
- (19) Buttery, R. G.; Flath, R. A.; Mon, T. R.; Ling, L. C. Identification of germacrene D in walnut and fig leaf volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **1986**, *34*, 820–822.
- (20) Grison, L.; Edwards, A. A.; Hossaert-McKey, M. Interspecies variation in floral fragrances emitted by tropical *Ficus* species. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 1293–1299.
- (21) Grison-Pigé, L.; Hossaert-McKey, M.; Greeff, J. M.; Bessière, J.-M. Fig volatile compounds – a first comparative study. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 61–71.
- (22) Schwab, W.; Davidovich-Rikanati, R.; Lewinsohn, E. Biosynthesis of plant-derived flavour compounds. *Plant J.* **2008**, *54*, 712–732.
- (23) Choudhary, V. R.; Chaudhari, P. A.; Narkhede, V. S. Solvent-free liquid phase oxidation of benzyl alcohol to benzaldehyde by molecular oxygen using non-noble transition metal containing hydro-talcite-like solid catalysts. *Catal. Commun.* **2003**, *4*, 171–175.
- (24) Kochi, M.; Takeuchi, S.; Mizutani, T.; Mochizuki, K.; Matsumoto, Y.; Saito, Y. Antitumor activity of benzaldehyde. *Cancer Treat. Rep.* **1980**, *64*, 21–23.
- (25) Goff, S. A.; Klee, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value? *Science* **2006**, *311*, 815–819.
- (26) Kakhiashvili, A.; Kolesnik, A. A.; Zherebin, Y. L.; Golubev, V. N. Liposoluble pigments of the fruit of *Ficus carica*. *Chem. Nat. Compd.* **1986**, *22*, 477–479.
- (27) Steliopoulos, P.; Wüst, M.; Adam, K.-P.; Mosandl, A. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ^{13}C and ^2H labeling studies. *Phytochemistry* **2002**, *60*, 13–20.
- (28) Cheng, S.-S.; Lin, H.-Y.; Chang, S.-T. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 614–619.
- (29) Dewick, P. M. Medicinal Natural Products. *A Biosynthetic Approach*. 3rd Ed. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, U.K., 1997.
- (30) Shah, J. Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2009**, *12*, 459–464.
- (31) Bruneton, J. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*, 3rd ed.; TEC & DOC: Paris, 1999.
- (32) Miksch, M.; Boland, W. Airborne methyl jasmonate stimulates the biosynthesis of furanocoumarins in the leaves of celery plants (*Apium graveolens*). *Cell. Mol. Life Sci.* **1996**, *52*, 739–743.
- (33) Tava, A.; Pecetti, L.; Ricci, M.; Pagnotta, M. A.; Russi, L. Volatile compounds from leaves and flowers of *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirt. (Fabaceae) from Italy. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22*, 363–370.
- (34) Valentão, P.; Trindade, P.; Gomes, D.; Guedes de Pinho, P.; Mouga, T.; Andrade, P. B. *Codium tomentosum* and *Plocamium cartilagineum*: chemical approach and antioxidant potential. *Food Chem.* **2010**, *119*, 1359–1368.
- (35) Beckman, J. S. Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, *9*, 836–844.
- (36) Singhara, A.; Macku, C.; Shibamoto, T. Antioxidative activity of brewed coffee extracts. In *Functional Foods for Disease Prevention II: Medicinal Plants and other Foods*; Shibamoto, T., Terao, J., Osawa, T., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1998; pp 101–109.
- (37) Enz, A.; Amstutz, R.; Boddeke, H.; Gmelin, G.; Malonowski, J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog. Brain Res.* **1993**, *98*, 431–445.
- (38) Silva, B. M.; Andrade, P. B.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Seabra, R. M.; Ferreira, M. A. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4705–4712.
- (39) Ferreres, F.; Pereira, D. M.; Valentão, P.; Andrade, P. B.; Seabra, R. M.; Sottomayor, M. New phenolic compounds and antioxidant potential of *Catharantus roseus*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9967–9974.

Received for review November 12, 2009. Revised manuscript received January 24, 2010. Accepted February 4, 2010. A.P.O. (SFRH/BD/47620/2008) is indebted to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for the grant.

5.5. Further insight into the latex metabolite profile of *Ficus carica*

J. Agric. Food Chem. 2010, 58, 10855-10863

Further Insight into the Latex Metabolite Profile of *Ficus carica*ANDREIA P. OLIVEIRA,[†] LUÍS R. SILVA,[†] PAULA B. ANDRADE,^{*,†} PATRÍCIA VALENTÃO,[†]
BRANCA M. SILVA,^{†,‡} RUI F. GONÇALVES,[†] JOSÉ A. PEREIRA,[§] AND
PAULA GUEDES DE PINHO^{*,||}[†]REQUIMTE/Laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Porto University,
Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal, [‡]CEBIMED/Research Group on Toxicology and
Phytochemistry, Faculty of Health Sciences, University Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia 296,
4200-150 Porto, Portugal, [§]CIMO/Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de
Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855 Bragança, Portugal, and ^{||}REQUIMTE/Laboratory of
Toxicology, Faculty of Pharmacy, Porto University, Rua Aníbal Cunha 164, 4050-047 Porto, Portugal

Latex is a sticky emulsion that exudes upon damage from specialized canals from several plants. It contains several biologically active compounds, such as phytosterols, fatty acids, and amino acids. In plants, these compounds are involved in the interaction between plants, insects, and the environment. Despite its chemical, biological, and ecological importance, *Ficus carica* latex is still poorly studied. To improve the knowledge on the metabolite profile of this matrix, a targeted metabolite analysis was performed in a representative sample from *F. carica* latex. Seven phytosterols were determined by gas chromatography–ion trap mass spectrometry (GC–ITMS) and high-performance liquid chromatography coupled to diode array detection (HPLC–DAD), with β -sitosterol and lupeol being the compounds present in higher concentrations (ca. 54 and 14%, respectively). A total of 18 fatty acids were characterized by GC–ITMS, being essentially represented by saturated fatty acids (ca. 86.4% of total fatty acids). A total of 13 free amino acids were also identified by high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet–visible spectroscopy (HPLC/UV–vis), and cysteine and tyrosine were the major ones (ca. 38.7 and 31.4%, respectively). In humans, phytosterols and some polyunsaturated fatty acids, such as linoleic acid, are known for their anticarcinogenic properties. With regard to amino acids, some of them, such as glycine, are neurotransmitters. Our results reveal the presence of a wide diversity of compounds, from distinct classes, in *F. carica* latex, possessing various potential pharmacological activities; thus, its biological potential appears to be worth further exploring.

KEYWORDS: *Ficus carica* latex; phytosterols; free and combined fatty acids; free amino acids

INTRODUCTION

Ficus carica L., the common fig, is widely used in the Middle East as food and medicine (1). Its latex released upon picking the fruits has been traditionally used, via topical application, in several conditions, such as gout, ulcers, and warts (1), because of its viscosity and proteolytic and keratolytic activities (2). Latex is an aqueous suspension of a complex mixture of molecules, found in specialized secretory cells of plants, known as laticifers. These cells synthesize and store diverse secondary metabolites in appreciable amounts, namely, terpenoids, alkaloids, tannins, and sterols (3, 4). Most of these compounds provide resistance to herbivores via toxicity or antinutritive effects, whereas others are involved in the stickiness that can trap different insects. In the context of humans, reduced amounts of latex are ingested only with the fresh fruits. However, latex is not ingested per se, and some precautions regarding the direct use are needed, because this

material is known to have keratolytic and corrosive properties (2). Additionally, saponins are reported in latex (5), and these compounds are known to cause erythrocyte destruction (6). Some of the compounds present in latex are interesting regarding human health, even in small amounts (4); for example, some sterols show anti-inflammatory, antipyretic, and antidiabetic activities (7), and proteins, such as ficin, are known for their anti-helminthic activity (8).

Phytosterols are cholesterol-like molecules found in most plant foods, with the highest concentrations occurring in vegetable oils. They are absorbed only in trace amounts but inhibit the absorption of intestinal cholesterol, including recirculating endogenous biliary cholesterol, a key step in cholesterol elimination (9). Plant materials contain free and esterified sterols that can be acylated, with β -sitosterol, campesterol, and stigmasterol being the more abundant ones in nature. These compounds are involved in important cellular processes, such as the regulation of membrane fluidity, adaptation of membranes to temperature (10), and also participation in cellular differentiation and proliferation (11).

*To whom correspondence should be addressed. Telephone: +351-222078934. Fax: +351-222003977. E-mail: pandrade@ff.up.pt (P.B.A.); pguedes@ff.up.pt (P.G.P.).

Fatty acids constitute signal molecules, energy storage, and protect plants from environmental and biological stress (12). In the human body, fatty acids act like hormones or their precursors, help the digestion process, and are a source of metabolic energy (13). Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from the ω -6 family have intense biological properties and are the biosynthetic precursors of eicosanoids (i.e., prostaglandins), having effects on cardiovascular diseases, triglyceride levels, and arthritis (14).

Furthermore, some amino acids are essential to human life and have many functions in plant metabolism (15). These compounds are not only building blocks of proteins but also participate in many metabolic networks that control growth and adaptation to the environment. They are involved in secondary plant metabolism, namely, in the biosynthesis of phenolic compounds, glucosinolates, cyanogenic heterosides, and alkaloids (15, 16). In humans, they are important in brain metabolism imbalances, as hormones, precursors of complex nitrogen-containing metabolites, neurotransmitters, metabolic intermediates, and alimentary supplements (15).

F. carica latex remains poorly studied. Its volatile and organic acid profiles have been recently described (17). The characterization of ficin, a cysteine proteinase (18), and a mixture of 6-*O*-acetyl- β -D-glucosyl- β -sitosterol isoforms (5) were already reported. On the other hand, some biological activities, namely, antioxidant, acetylcholinesterase inhibition (17), antifungal, anti-helminthic (19, 20), and anticarcinogenic (1, 5, 21), were previously found.

Thus, the aim of the present work was to improve the knowledge on its metabolite composition, to obtain more information on potential healthy constituents, namely, phytosterols, fatty acids, and free amino acids, for further possible exploitation. Analytical methods previously validated for other matrices were applied, and the chemical composition was compared to that of other *F. carica* materials. Nevertheless, some validation parameters for our matrix were also assessed. Following these purposes, the determination of phytosterol and fatty acid profiles was pursued, using high-performance liquid chromatography coupled to diode array detection (HPLC–DAD) and gas chromatography–ion trap mass spectrometry (GC–ITMS). In addition, the free amino acid composition was determined by high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet–visible spectroscopy (HPLC/UV–vis), after precolumn derivatization with dansyl chloride.

MATERIALS AND METHODS

Standards and Reagents. All chemicals used were of analytical grade. The standard compounds were purchased from various suppliers. Myristic, pentadecanoic, palmitic, heptadecanoic, *cis*-10-heptadecenoic, stearic, oleic, elaidic, linoleic, arachidic, heneicosanoic, behenic, tricosanoic, and lignoceric acid methyl esters were from Supelco (Bellefonte, PA). All L-amino acids, β -sitosterol, lanosterol, lupeol, lupeol acetate, and betulin were from Sigma (St. Louis, MO). β - and α -amyrin were from Extrasynthèse (Genay, France), and methyl jasmonate (internal standard) was from SAFC (St. Louis, MO). Methanol, dichloromethane, *n*-hexane, acetonitrile, ethanol, and phosphoric acid were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Anhydrous sodium sulfate, hydrochloric acid, and isooctane were from Panreac Quimica SA (Barcelona, Spain). Potassium hydroxide was obtained from Pronalab (Lisboa, Portugal). Boron trifluoride (BF₃) 10% methanolic solution was purchased from Supelco (Bellefonte, PA). Dansyl chloride reagent, sodium hydrogen carbonate, sodium dihydrogenophosphate dimethylformamide, and triethylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO). Water was deionized using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA).

Latex Sample. To obtain a representative sample, latex was collected from 20 *F. carica* trees under the same environmental and soil characteristics, in the Mirandela region, Portugal. All samples were harvested manually at the same stage of maturation (June of 2009), without using

steel knives, by incising the stalk of the green fruit from the main branch. The samples were obtained drop-by-drop without squeezing, mixed and homogenized, weighted, separated by aliquots, and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processed.

Phytosterol Analysis. Solvent Extraction. Two different solvents, dichloromethane and *n*-hexane, were tested. A total of 1.0 g of latex was extracted with 25 mL of each solvent for 4 h, in the dark, with magnetic stirring (300 rpm). The resulting extract was then filtered through a Buchner funnel, under vacuum. Afterward, the extract was dehydrated with 0.5 g of anhydrous sodium sulfate and concentrated under a stream of nitrogen to obtain a final volume of 0.3 mL. This procedure was performed in triplicate.

As Rubnov et al. (5) have described the presence of phytosterols conjugated with glucosyl groups in latex, acid and alkaline hydrolysis were performed to obtain the free phytosterol composition.

Acid Hydrolysis. The method described by Toivo et al. (22) was followed, with some modifications. Briefly, 1.0 g of latex was acidified by refluxing with 20 mL of 0.5 M ethanolic HCl for 1 h, under a constant temperature (80 $^{\circ}\text{C}$). The mixture was then centrifuged, decanted, and transferred to a separation funnel, to extract the unsaponifiable fraction with *n*-hexane (3 \times 10 mL). The organic phase was evaporated to dryness in a rotary evaporator (Büchi R-114), and the residue was dissolved in 1 mL of methanol and then filtered through a 0.22 μm polytetrafluoroethylene membrane (Millipore, Bedford, MA). This procedure was performed in triplicate.

Alkaline Hydrolysis. The conditions used for saponification and extraction were adapted from those proposed by Sánchez-Machado et al. (23), with some modifications. Briefly, 1.0 g of latex was saponified by refluxing with 20 mL of 1 M ethanolic KOH for 1 h, at constant temperature (80 $^{\circ}\text{C}$). The mixture was then centrifuged, decanted, and transferred to a separation funnel, to extract the unsaponifiable fraction with *n*-hexane (3 \times 10 mL). The organic phase was evaporated to dryness in a rotary evaporator (Büchi R-114), and the residue was dissolved in 1 mL of methanol and then filtered through a 0.22 μm polytetrafluoroethylene membrane (Millipore, Bedford, MA). This procedure was performed in triplicate.

GC–ITMS Conditions. The extracts obtained by hydrolysis and direct solvent extraction were analyzed on a Varian CP-3800 gas chromatographer (Walnut Creek, CA) equipped with a Varian Saturn 4000 mass selective detector (Walnut Creek, CA) and Saturn GC/MS workstation software, version 6.8 (Walnut Creek, CA). The column used for identification was a VF-5 ms, 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm (FactorFour), from Varian. The injector port was heated to 250 $^{\circ}\text{C}$. Solvent extracts were injected in split mode, with a 1:40 ratio. The carrier gas was helium C-60 (Gasin, Portugal), at 1 mL/min, constant flow. The oven temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$ (for 1 min), then increasing 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to 220 $^{\circ}\text{C}$, and held for 30 min. All mass spectra were acquired in the electron impact (EI) positive mode. Ionization was maintained off during the first 3 min, to avoid solvent overloading. The ion trap detector was set as follows: the transfer line, manifold, and trap temperatures were 280, 50, and 180 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The mass range was m/z 50–1000, with a scan rate of 6 scan/s. The emission current was 50 μA , and the electron multiplier was set in relative mode to the auto-tune procedure. The maximum ionization time was 25 000 μs , with an ionization storage level of m/z 35. The injection volume was 1 μL , and the analysis was performed in full-scan mode. Compounds were identified by a comparison of retention times and MS fragmentation pattern to those of standards analyzed under the same conditions, and a mass spectra database search was performed using the National Institute of Standards and Technology (NIST) MS 05 spectral database.

HPLC–DAD Conditions. A total of 20 μL of extracts obtained by hydrolysis or direct solvent extraction were analyzed at room temperature in a HPLC unit (Gilson), using a reversed-phase Hypersil ODS (20 \times 0.4 cm inner diameter \times 5 μm particle size) column, according to Sánchez-Machado et al. (23). The mobile phase was methanol:acetonitrile (30:70), at a flow rate of 0.8 mL/min, in isocratic mode. Detection was achieved with Gilson DAD. Spectral data from all peaks were accumulated in the 190–400 nm range. The data were processed on Unipoint system software (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France). Peak purity was checked by the software contrast facilities. Phytosterols were identified by a comparison of retention times and UV absorption spectra to those obtained for authentic standards. Quantification was achieved by the

absorbance recorded in the chromatograms at 205 nm relative to external calibration standards.

Fatty Acid Analysis. *Derivatization.* The fatty acid derivatization was performed according to a described procedure (24), with some modifications. Briefly, 500 mg of *F. carica* latex was redissolved in 5 mL of methanol. The lipids in the extract were hydrolyzed with 1 mL of KOH methanolic solution (11 g/L), at 90 °C, for 10 min. The free fatty acids originally present and those resulting from the alkaline hydrolysis were derivatized to their methyl ester forms with 1 mL of BF₃ methanolic solution (10%), at 90 °C, for 10 min. The methyl ester derivatives were extracted with 2 × 6 mL of isooctane, and anhydrous sodium sulfate was added to ensure the total absence of water. The resulting extract was evaporated to dryness under a stream of nitrogen and redissolved in 400 μ L of isooctane. All assays were performed in triplicate.

GC–ITMS Conditions. The conditions used were similar to those described for GC–ITMS phytosterol analysis, with some modifications. The oven temperature was set at 40 °C for 1 min, then increasing 5 °C/min to 250 °C, 3 °C/min to 300 °C, and held for 15 min. Ionization was maintained off during the first 4 min, to avoid solvent overloading. The mass ranged from m/z 50 to 600, with a scan rate of 6 scan/s. The amount of fatty acid methyl esters (FAMES) present in the extract was achieved from the calibration curve of the respective FAME standards. The FAME values were then converted to the respective fatty acid contents.

Amino Acid Analysis. *Extraction.* A total of 3.0 g of latex was extracted with 10 mL of 0.1 M HCl, with magnetic stirring (300 rpm), for 1 h. The resulting extract was then filtered and kept at –20 °C until derivatization.

Derivatization. The dabsylation process was performed as reported by Silva et al. (25). Briefly, aliquots of 20 μ L of standard solution and latex sample were diluted with 180 μ L of the reaction buffer (0.15 M sodium hydrogen carbonate at pH 8.6, adjusted with 2 N NaOH). After thorough mixing on a vortex mixer, 200 μ L of reagent (12.4 mM dabsyl chloride in acetone) was added and the solutions were agitated again. The resulting solutions were incubated at 70 °C in a water bath, for 15 min. The reaction was stopped by placing the vials in an ice bath for 5 min. A total of 400 μ L of the dilution buffer [mixture of 50 mL of acetonitrile, 25 mL of ethanol, and 25 mL of 9 mM sodium dihydrogenophosphate; 4% dimethylformamide and 0.15% triethylamine (pH 6.55, adjusted with 85% phosphoric acid)] was added, followed by mixing and centrifugation (5 min, 5000 rpm), and 20 μ L of the clear supernatants was directly set for injection.

HPLC/UV–vis Conditions. Dabsyl derivatives of free amino acids were separated on a Gilson HPLC unit, using a reversed-phase Spherisorb ODS2 (25.0 × 0.46 cm; 5 μ m particle size) column, as before (25). The solvent system consisted of (A) 9 mM sodium dihydrogenophosphate, 4% dimethylformamide, and 0.15% triethylamine (pH 6.55, adjusted with 85% phosphoric acid) and (B) 80% acetonitrile in water. Elution was performed at a flow rate of 1 mL/min, starting with 20% B until 7 min and installing a gradient to obtain 35% B at 35 min, 50% B at 45 min, and 100% B at 66 min. Detection was achieved with a UV–vis detector set at 436 nm. Free amino acid quantification was accomplished by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external calibration standards.

RESULTS AND DISCUSSION

As already referred, the chemical composition of *F. carica* latex is poorly studied. The few existing works concern the volatile and organic acid profiles (17), the characterization of a proteinase (18), and a mixture of 6-*O*-acyl- β -D-glucosyl- β -sitosterol isoforms (5). The presence of other compounds was checked to improve the knowledge on the metabolic profile of this matrix.

Phytosterol Profile. *Analytical Procedure.* To achieve the most suitable conditions for the analysis of phytosterols present in latex, several extracts were prepared. Thus, phytosterols in the extracts obtained using two organic solvents (dichloromethane and *n*-hexane) and in hydrolyzed (acid and alkaline) latex were identified by GC–ITMS and quantified by HPLC–DAD. The hydrolysis of latex was performed because phytosterols conjugated with glucosyl groups were previously described in this matrix (5). Therefore, the hydrolysis procedure allows for the

separation of these compounds and their subsequent identification.

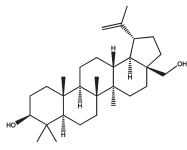
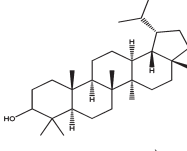
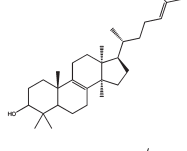
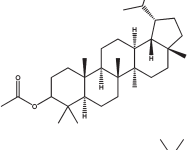
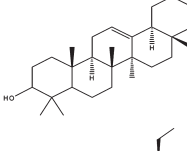
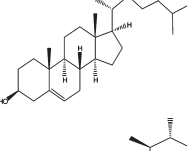
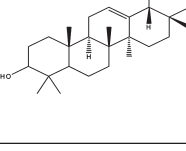
Using GC–ITMS, seven phytosterols were identified in the latex extracts (Table 1). The same extracts were also analyzed by HPLC–DAD, and the phytosterols were quantified by this technique because it revealed a better chromatographic separation, in a shorter analysis time (25 min), compared to GC–ITMS. Thus, HPLC–DAD was faster and cheaper, which renders it suitable for routine analysis, besides being more available than GC–ITMS. The analysis of both hydrolyzed extracts by HPLC–DAD allowed for the separation of different phytosterols, with the extract of alkaline hydrolysis being the one giving the best results (Figure 1).

Under the analyzed conditions (alkaline hydrolysis followed by HPLC–DAD analysis), seven compounds were identified in *F. carica* latex unsaponifiable fraction: betulol, lupeol, lanosterol, lupeol acetate, β -amyrin, β -sitosterol, and α -amyrin, with β -sitosterol being the compound present in highest quantities (ca. 54% of total determined phytosterols) and α -amyrin being the minor one (ca. 0.4%) (Figure 1 and Tables 1 and 2). Calibration curves were obtained with standard solutions at four different concentrations, selected as representative of the range of concentrations of the compounds in *F. carica* latex. The calibration plots showed a good correlation, as indicated by correlation coefficient values higher than 0.98 for all phytosterols (Table 2). The limit of detection ($LOD = 3S_0/b$) and limit of quantification ($LOQ = 10S_0/b$) (where S_0 is the standard deviation of the signal-to-noise ratio of a low concentration standard and b is the slope of the calibration plot) (26) for the analyzed phytosterols are shown in Table 2. To study the phytosterol recovery, aliquots of lupeol standard solution were treated as the sample and quantified by HPLC–DAD, with a recovery of 91% (± 1.5). Repeatability was checked by analyzing the same sample 5 times, by the same analyst, within the same day; the coefficients of variation were lower than 20% (Table 2), indicating that the repeatability of the procedure was good. Additionally, the interday precision was determined by analyzing the sample on 5 different days (5 injections/day). The coefficients of variation obtained were always lower than 15%, and the method presented a satisfactory interday precision (Table 2).

As far as we know, with the exception of β -sitosterol derivatives already reported (5), the other phytosterols are described for the first time in *F. carica* latex. β -Sitosterol was the main phytosterol identified in latex, which is in agreement with the results obtained before (27) with the unsaponifiable fraction of *F. carica* leaves and fresh and dried fruits. In comparison to other matrices known for their high level of phytosterols, such as nuts and seeds (0.95–4.13 g/kg) (28) and oilseed rape (1.41–15.57 g/kg) (29), *F. carica* latex is a richer source of this class of compounds (19.6 g/kg), which could be isolated or a purified extract could be prepared for further application in several industries.

In human nutrition, only small amounts of latex are ingested with fresh figs. Furthermore, the intake of phytosterols may cause a decrease in plasma cholesterol levels, which can be due to not only the inhibition of intestinal cholesterol absorption but also other effects on hepatic/intestinal cholesterol metabolism (30). Additionally, anticarcinogenic, anti-inflammatory, and antidiabetic activities are also verified for products given orally (31), being important health promoter components of the diet. In plants, these compounds are resultant from the isoprenoid biosynthetic pathway and derive from squalene (11). The differences between higher plants and yeast/mammals in the biosynthesis of sterols are generally accepted to begin at the cyclization step of 2,3-oxidosqualene, a common precursor. Phytosterols, such as

Table 1. Structures and Mass Spectrum Data of Identified Sterols

Phytosterol	Mass spectrum (m/z) ^a	Structure
Betulol	189(100); 95(78); 207(75); 203(71); 135(69); 411(64); 81(53); 121(51); 107(50); 109(48); 442 (M ⁺)	
Lupeol	43(100); 68(98); 55(87); 67(78); 81(76); 69(73); 95(72); 93(68); 41(67); 109(61); 426 (M ⁺)	
Lanosterol	69(100); 43(91); 55(64); 41(64); 411(54); 109(44); 95(42); 426(35); 81(33); 57(32); 426 (M ⁺)	
Lupeol acetate	43(100); 189(75); 95(75); 109(71); 69(70); 81(65); 121(61); 107(58); 93(56); 55(55); 468 (M ⁺)	
β-Amyrin	218(100); 203(26); 219(18); 189(10); 95(9); 69(8); 109(8); 135(7); 81(6); 207(6); 426 (M ⁺)	
β-Sitosterol	43(100); 55(36); 41(33); 57(31); 107(30); 81(28); 414(28); 95(27); 105(25); 69(24); 414 (M ⁺)	
α-Amyrin	218(100); 219(18); 203(16); 189(11); 135(10); 122(10); 95(10); 426(9); 207(9); 109(8); 426 (M ⁺)	

^a Values represent fragmentation ions (relative abundance, %). GC–ITMS conditions: oven temperature at 40 °C (for 1 min), 2 °C/min to 220 °C, and held for 30 min; injector port heated to 250 °C, in split mode, with a ratio of 1:40; carrier gas, helium C-60 (Gaslin, Portugal), at 1 mL/min, constant flow; chromatographic column, VF-5 ms, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (FactorFour), from Varian.

campesterol, stigmasterol, and β-sitosterol, are biosynthesized via cycloartenol in higher plants. β-Sitosterol is the principal Δ⁵-sterol in several plant materials, being one of the most efficient compounds acting in membranes to restrict the motion of fatty acyl chains, because of its stereochemistry, associated with the presence of a 24-ethyl group at C-24 (11).

Lupeol synthases cyclize 2,3-oxidosqualene, promote ring expansion and annulation to lupyl cation, and terminate by abstracting the C-29 proton to form lupeol (32). This compound has been described in *F. carica* fruits and exhibits several pharmacological properties, including beneficial activities against inflammation, cancer, diabetes, and renal and hepatic toxicities (33).

Lanosterol is synthesized from 2,3-oxidosqualene by lanosterol synthase (32). As far as we know, this compound is described for the first time in this species.

β- and α-amyrin synthases also form the lupyl cation but allow further ring expansion and some rearrangement before deprotonation to β- and α-amyrin, respectively (32), which have been known to possess anti-inflammatory, anti-ulcer, anti-hyperlipidemic, anti-tumor, and hepatoprotective activities (34).

These compounds have been described in this species, namely, in dried fig fruits and branches (27), and are known to be precursors of saponins (32).

Betulol [lup-20(29)-ene-3β,28-diol], also known as betulin, is an abundant naturally occurring triterpene, predominantly found in bushes and trees. This phytosterol can be easily converted to betulinic acid, which possesses a wide spectrum of biological and pharmacological activities, such as antimalarial and anti-inflammatory activities (35).

Considering its high phytosterol content, *F. carica* latex may be incorporated in products to be used orally, such as pharmaceuticals (as therapeutic steroids) and functional foods (as anti-cholesterol additives), or topically, such as cosmetics (in creams and lipsticks) (31).

Fatty Acid Profile. The fatty acid profile of *F. carica* latex was determined by GC–ITMS and revealed to be composed of 14 major detectable fatty acids (Table 3 and Figure 2). The linearity was obtained with standard solutions at five different concentrations, selected as representative of the range of concentrations of the compounds in *F. carica* latex, with a good correlation being

found (correlation coefficient values higher than 0.98 for all fatty acids) (Table 3). The LOD and LOQ for the analyzed compounds are indicated in Table 3. To evaluate the fatty acid recovery, aliquots of oleic acid standard solution were treated as the sample and quantified by GC–ITMS, with a recovery of 95% (± 1.6) being obtained. Repeatability and interday precision were determined, and the coefficients of variation found were lower than 20 and 15%, respectively (Table 3), which indicate that the repeatability and interday precision of the procedure were good.

As far as we know, among the determined fatty acids, myristic, pentadecanoic, heptadecanoic, *cis*-10-heptadecenoic, linoleic, arachidic, heneicosanoic, behenic, tricosanoic, and lignoceric acids are reported for the first time in *F. carica* latex. Studies performed with latex produced from other species revealed that this material is characterized by low total lipid quantities (36), as with our sample. Nevertheless, Kitahara et al. (37) demonstrated that, even in small amounts, fatty acids show interesting biological activities, namely, as antimicrobial agents, for which they may be potential antimicrobial material and ointment base for infection control. Thus, the extraction and preconcentration of this matrix may provide an interesting material to be incorporated in pharmaceutical, cosmetic, and nutraceutical formulations for topical and oral use.

Palmitic, arachidic, and behenic acids were the major fatty acids (ca. 21.4, 44.1, and 13.1% of total fatty acid content, respectively) (Table 3). Latex is essentially constituted by saturated fatty acids (SFAs) (ca. 86.4% of total fatty acids), unlike what happens with dried and fresh fruits, which are predominantly composed of polyunsaturated fatty acids (ca. 84 and 69% of total fatty acids, respectively) (27, 38). According to other authors (27, 38), the SFA profile of *F. carica* dried and fresh fruits mainly presents palmitic acid, which agrees with the high content of this compound in *F. carica* latex.

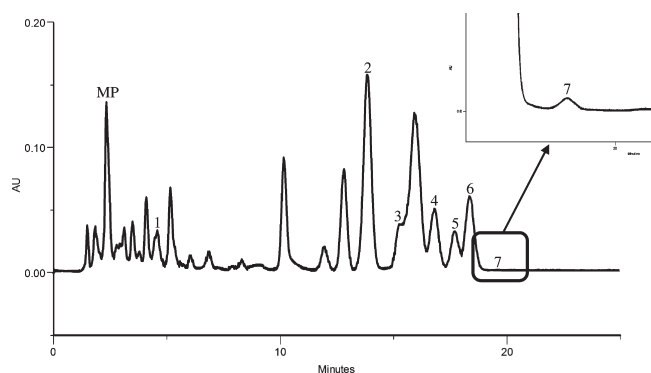


Figure 1. HPLC–DAD phytosterol chromatogram of *F. carica* latex hydrolyzed with 1 M KOH (detection at 205 nm). Peaks: (MP) mobile phase, (1) betulol, (2) lupeol, (3) lanosterol, (4) lupeol acetate, (5) β -amyrin, (6) β -sitosterol, and (7) α -amyrin.

With respect to monounsaturated fatty acids (MUFAs), oleic acid (C18:1*n*9) was the most abundant one (ca. 95% of MUFA total content), which is in agreement with data found for *F. carica* fruit (27, 38) (Table 3). Oleic acid is included in the ω -9 family and is not essential for humans, because they possess all of the enzymes required for its synthesis. Under severe conditions of essential fatty acid deprivation, mammals elongate and desaturate oleic acid to produce mead acid (C20:3*n*9) (39). Oleic acid has been described in several materials, including fresh and dried fig fruits and is recognized for its effectiveness in reducing cholesterol levels and promoting the decrease of cardiovascular diseases and for its antidiabetic and anti-inflammatory properties (27, 38, 40).

With regard to polyunsaturated fatty acids (PUFAs), linoleic acid was the only compound identified (ca. 9.9% of total fatty acids) (Table 3). This compound has already been described in dried and fresh fig fruits (27, 38). It is an essential fatty acid because it cannot be synthesized by humans, as a result of the lack of desaturase enzymes required for its production. It must be obtained from the diet and originates the ω -6 fatty acid series, which includes γ -linolenic and arachidonic acids (39). Linoleic acid can convert to hormone-like substances called eicosanoids, which affect physiological reactions ranging from blood clotting to immune response (27).

Amino Acid Profile. The characterization of the free amino acid profile of *F. carica* latex by HPLC/UV–vis revealed the presence of 13 compounds, comprising essential (not synthesized by humans) and non-essential amino acids (Table 4 and Figure 3), which, as far as we know, are reported for the first time in this material. A linear relationship was obtained with standard solutions at five different concentrations, selected as representative of the range of concentrations of the compounds in *F. carica* latex; a good correlation, with coefficient values higher than 0.90 for all amino acids, was found (Table 4).

To determine the amino acid recovery, aliquots of cysteine standard solution were treated as the sample and quantified by HPLC/UV–vis, with a recovery of 90% (± 1.3). Repeatability and interday precision were determined, with coefficients of variation lower than 20 and 15% being found, respectively (Table 4), thus indicating that the repeatability and interday precision of the procedure were good.

Despite *F. carica* latex exhibiting low levels of amino acids, when compared to *Hevea brasiliensis* latex, our matrix is characterized by higher total amounts of these compounds (41). Some of them, such as glycine and glutamine, have an important role in the treatment of brain metabolism imbalance and as neurotransmitters (42). Although *F. carica* latex presents reduced amino acid content, the extraction and preconcentration of this matrix may render an interesting material to be used topically or orally in formulations for health promotion. Cysteine and tyrosine were clearly the compounds present in higher quantities relatively to the other free amino acids (ca. 38.7 and 31.4% of total amino acid

Table 2. Linearity, Detection and Quantification Limits, Repeatability, Precision, and Phytosterol Composition of *F. carica* Latex^a

phytosterol	regression equations	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	repeatability (CV %)	interday precision (CV %)	mg/kg ^b
betulol	$y = 1 \times 10^8 x + 4 \times 10^6$	0.9915	1.4	4.7	6.1	9.0	326.6 \pm 32.2
lupeol	$y = 3 \times 10^8 x + 5 \times 10^6$	0.9937	10.4	34.8	5.3	5.7	2827.4 \pm 2.3
lanosterol	$y = 6 \times 10^8 x - 2 \times 10^7$	0.9897	117.9	392.9	5.6	10.5	2634.1 \pm 275.6
lupeol acetate	$y = 2 \times 10^8 x + 7 \times 10^6$	0.9986	67.5	225.0	3.9	9.3	1988.9 \pm 20.6
β -amyrin	$y = 3 \times 10^8 x + 2 \times 10^7$	0.9905	155.6	518.6	3.1	3.6	1197.0 \pm 41.0
β -sitosterol	$y = 1 \times 10^8 x + 5 \times 10^6$	0.9884	62.8	209.4	4.0	4.9	10564.3 \pm 251.8
α -amyrin	$y = 2 \times 10^8 x - 1 \times 10^7$	0.9959	194.2	647.3	12.5	13.5	76.2 \pm 17.8
total							19614.5

^a LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; CV, coefficient of variation. ^b Values are expressed as mean \pm standard deviation of three assays.

Table 3. Linearity, Detection and Quantification Limits, Repeatability, Precision, and Free Fatty Acid Composition of *F. carica* Latex

fatty acid ^a	mass spectrum (m/z) ^b	regression equations	R ²	LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)	repeatability (CV %)	interday precision (CV %)	mg/kg ^c
C14:0	73 (100), 60 (95), 43 (86), 41 (73), 57 (73), 55 (57), 228 (44), 129 (44), 29 (42), 71 (38), 228 (M ⁺)	y = 34968x – 407.1	0.9998	18.96	63.20	1.07	2.04	0.56 ± 0.01
C15:0	43 (100), 73 (92), 60 (92), 41 (87), 55 (68), 57 (64), 29 (54), 69 (34), 71 (33), 242 (30), 242 (M ⁺)	y = 41478x – 1075.9	0.9947	91.27	304.23	7.74	11.9	1.35 ± 0.02
C16:0	43 (100), 73 (91), 60 (84), 41 (75), 57 (63), 55 (62), 29 (41), 69 (31), 71 (29), 61 (22), 256 (M ⁺)	y = 69568x – 5994.2	0.9880	266.5	888.37	2.13	9.99	28.94 ± 1.12
C17:0	73 (100), 80 (86), 57 (78), 43 (76), 270 (69), 129 (51), 71 (46), 41 (45), 55 (43), 69 (32), 270 (M ⁺)	y = 28597x – 751.3	0.9964	98.33	327.77	2.76	6.42	0.66 ± 0.03
C17:1	74 (100), 87 (66), 43 (55), 57 (42), 55 (41), 41 (34), 69 (28), 71 (23), 143 (23), 83 (22), 270 (M ⁺)	y = 43962x – 1152.4	0.9965	91.33	304.44	2.81	5.02	nq [*]
C18:0	43 (100), 73 (34), 60 (81), 57 (76), 41 (70), 55 (64), 29 (38), 71 (37), 69 (35), 129 (32), 284 (M ⁺)	y = 49782x – 1094.5	0.9933	77.17	257.22	0.99	2.89	8.62 ± 0.20
C18:1c	55 (100), 69 (76), 41 (75), 83 (59), 43 (55), 97 (44), 57 (44), 67 (35), 56 (35), 70 (32), 282 (M ⁺)	y = 161434x – 5193.8	0.9994	99.28	333.25	1.99	3.65	5.54 ± 0.73
C18:1t	55 (100), 69 (83), 41 (70), 83 (69), 264 (54), 43 (51), 97 (50), 57 (42), 70 (38), 56 (36), 282 (M ⁺)	y = 56860x – 1589.6	0.9864	93.68	312.28	4.45	8.48	0.35 ± 0.07
C18:2	67 (100), 81 (88), 82 (73), 95 (63), 68 (60), 55 (60), 96 (55), 41 (54), 54 (45), 69 (36), 280 (M ⁺)	y = 315587x + 5906.3	0.9974	54.29	181.27	2.25	7.35	14.59 ± 0.73
C20:0	43 (100), 57 (79), 73 (71), 41 (69), 55 (66), 60 (61), 71 (43), 69 (35), 29 (31), 85 (26), 312 (M ⁺)	y = 43010x – 641.3	0.9967	57.77	192.35	4.28	8.48	91.29 ± 1.12
C21:0	98 (100), 74 (79), 55 (73), 69 (49), 87 (46), 84 (41), 112 (39), 97 (29), 83 (29), 353 (25), 326 (M ⁺)	y = 42367x – 1421.4	0.9930	113.82	379.40	5.97	7.74	0.77 ± 0.08
C22:0	340 (100), 57 (51), 73 (41), 43 (39), 129 (38), 71 (35), 55 (29), 97 (29), 97 (29), 60 (28), 83 (26), 340 (M ⁺)	y = 47023x – 2643.2	0.9965	180.50	601.66	1.08	1.68	26.43 ± 0.49
C23:0	43 (100), 354 (75), 55 (71), 41 (69), 57 (69), 60 (63), 73 (62), 69 (38), 71 (37), 129 (35), 354 (M ⁺)	y = 40762x – 1670.4	0.9930	136.63	455.42	1.91	3.67	1.25 ± 0.01
C24:0	43 (100), 57 (100), 73 (80), 60 (61), 55 (58), 71 (56), 129 (51), 41 (51), 69 (42), 368 (M ⁺)	y = 84071x – 3003.9	0.9945	114.90	383.00	3.29	6.24	1.90 ± 0.17
total								182.25
SFA								161.77
MUFA								5.89
PUFA								14.59

^a C14:0, myristic acid; C15:0, pentadecanoic acid; C16:0, palmitic acid; C17:0, heptadecanoic acid; C17:1, *cis*-10-heptadecenoic acid; C18:0, stearic acid; C18:1c, oleic acid; C18:1t, elaidic acid; C18:2, linoleic acid; C20:0, arachidic acid; C21:0, heneicosanoic acid; C22:0, behenic acid; C23:0, tricosanoic acid; C24:0, lignoceric acid; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; CV, coefficient of variation. ^b Values represent fragmentation ions (relative abundance, %). Chromatographic conditions: oven temperature at 40 °C (for 1 min), 5 °C/min to 250 °C, 3 °C/min to 300 °C, and held for 15 min; injector port heated to 250 °C, in split mode, with a ratio of 1:40; carrier gas, helium C-60 (Gasin, Portugal), at 1 mL/min, constant flow; chromatographic column, VF-5 ms, 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm (FactorFour), from Varian. ^c Results are expressed as mean ± standard deviation of three determinations. *Compound present in the matrix below the limit of quantification.

content, respectively), followed by tryptophan (ca. 22.2%) (Table 4). All of the determined amino acids were already described in dried figs (43).

In young plants, amino acid biosynthesis is regulated by a metabolic network that links nitrogen assimilation with carbon metabolism. This network is strongly controlled by the metabolism of four central amino acids, namely, glutamine, glutamate, aspartate, and asparagine, which are then converted into all other amino acids in various biochemical processes. They also serve as major transport molecules of nitrogen, including transport from vegetative to reproductive tissues. Its metabolism is subjected to a concerted regulation by physiological, developmental, and hormonal signals (15).

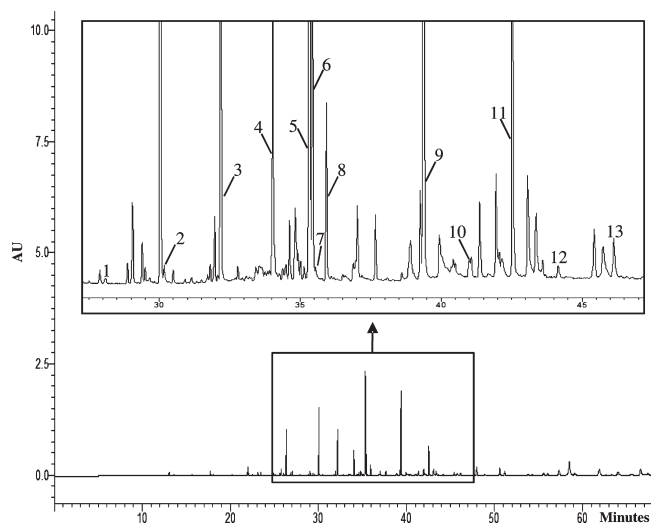


Figure 2. GC–ITMS profile of methyl esters of free fatty acids of *F. carica* latex. Peaks: (1) myristic acid (C14:0), (2) pentadecanoic acid (C15:0), (3) palmitic acid (C16:0), (4) heptadecanoic acid (C17:0), (5) linoleic acid (C18:2), (6) oleic acid (C18:1c), (7) elaidic acid (C18:1t), (8) stearic acid (C18:0), (9) arachidic acid (C20:0), (10) heneicosanoic acid (C21:0), (11) behenic acid (C22:0), (12) tricosanoic acid (C23:0), and (13) lignoceric acid (C24:0).

Cysteine, which is one of the major compounds identified, is formed from *O*-acetylserine and sulfide, catalyzed by *O*-acetylserine(thiol)-lyase (44). Its biosynthesis in plants constitutes an essential part of the sulfur cycle in nature (45). This amino acid is necessary for the detoxification of harmful toxins from the body, protecting the brain and liver from alcohol and drug damage (45, 46).

Tyrosine, tryptophan, and phenylalanine are three aromatic amino acids, biosynthesized from the shikimate pathway, having chorismate as a precursor (47). These amino acids are precursors of a large variety of secondary metabolites, such as phenylpropanoids and alkaloids, which are important in plant metabolism (47). Tyrosine is a precursor of the neurotransmitters epinephrine and dopamine and is useful in the suppression of appetite (46). Tryptophan is a precursor of serotonin, being used in insomnia, anxiety, and depression conditions (45, 46). When combined with UV radiation, phenylalanine can be used for vitiligo treatment (46).

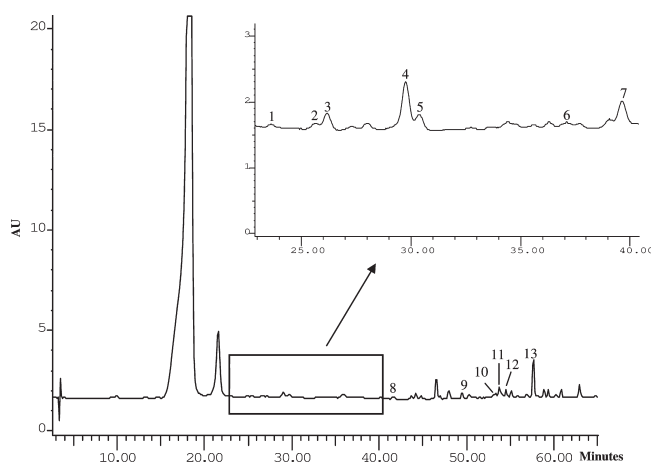


Figure 3. HPLC/UV–vis chromatogram of *F. carica* latex free amino acids (detection at 436 nm): (1) asparagine, (2) glutamine, (3) serine, (4) glycine, (5) alanine, (6) leucine, (7) tryptophan, (8) phenylalanine, (9) cysteine, (10) ornithine, (11) lysine, (12) histidine, and (13) tyrosine.

Table 4. Linearity, Detection and Quantification Limits, Repeatability, Precision, and Amino Acid Composition of *F. carica* Latex^a

amino acid	regression equations	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	repeatability (CV %)	interday precision (CV %)	mg/g ^b
Essential Amino Acid							
leucine	$y = 1.0 \times 10^7 x + 2438.2$	0.9881	0.57	1.90	6.52	11.4	$0.036 \pm 1.8 \times 10^{-6}$
tryptophan	$y = 1.0 \times 10^7 x + 4065.5$	0.9829	1.20	4.01	9.61	13.4	$1.598 \pm 2.1 \times 10^{-3}$
phenylalanine	$y = 8.0 \times 10^7 x + 3584.1$	0.9834	0.13	0.43	13.4	13.8	$0.015 \pm 4.8 \times 10^{-6}$
lysine	$y = 1.0 \times 10^7 x + 3293.4$	0.9563	0.97	3.25	6.93	12.1	$0.010 \pm 2.5 \times 10^{-7}$
histidine	$y = 3.0 \times 10^6 x + 3384.4$	0.9455	3.33	11.10	5.25	14.3	$0.058 \pm 2.0 \times 10^{-4}$
Σ							1.717
Non-essential Amino Acid							
asparagine	$y = 3.0 \times 10^6 x + 1432.9$	0.9603	7.79	25.98	8.98	10.8	$0.058 \pm 7.2 \times 10^{-5}$
alanine	$y = 1.0 \times 10^7 x + 5653.8$	0.9854	1.43	4.76	5.57	8.50	$0.008 \pm 3.8 \times 10^{-6}$
glutamine	$y = 3.0 \times 10^6 x + 762.39$	0.9910	0.60	2.00	11.3	11.5	$0.034 \pm 2.2 \times 10^{-5}$
serine	$y = 4.0 \times 10^6 x + 4344.5$	0.9832	3.04	10.14	8.70	10.5	$0.060 \pm 1.8 \times 10^{-7}$
glycine	$y = 1.0 \times 10^7 x + 20161$	0.9641	6.03	20.10	3.41	7.40	$0.004 \pm 4.2 \times 10^{-7}$
ornithine	$y = 1.0 \times 10^7 x + 4914.7$	0.9033	1.38	4.60	6.72	7.00	$0.270 \pm 3.4 \times 10^{-4}$
tyrosine	$y = 5.0 \times 10^6 x + 10991$	0.9197	6.34	21.10	10.2	13.2	$2.264 \pm 1.7 \times 10^{-3}$
cysteine	$y = 8.3 \times 10^5 x + 1434.5$	0.9162	4.74	15.80	7.65	10.0	$2.786 \pm 4.8 \times 10^{-4}$
Σ							5.484
total of all amino acids							7.201

^a LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; CV, coefficient of variation; Σ , sum of the determined amino acids. ^b Values are expressed as mean \pm standard deviation of three assays.

In conclusion, this work provides quantitative and qualitative data of a large number of metabolites, namely, phytosterols, fatty acids, and amino acids, giving a broader view of the *F. carica* latex metabolic profile. A total of 6 phytosterols, 10 fatty acids, and 13 amino acids were described for the first time, improving the knowledge on the chemical composition of this matrix. All of these identified compounds develop determinant roles in defense, metabolism, and plant ecological interactions. Some of them also have important biological activities in both plants and humans. Attending to the compounds determined and to the biological activities attributed to them, further assays regarding the potential of this matrix as a source of bioactive compounds or even its direct use deserve to be developed.

LITERATURE CITED

- (1) Lansky, E. P.; Paavilainen, H. M.; Pawlus, A. D.; Newman, R. A. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 195–213.
- (2) Hemmatzadeh, F.; Fatemi, A.; Amini, F. Therapeutic effects of fig tree latex on bovine papillomatosis. *J. Vet. Med., Ser. B* **2003**, *50*, 473–476.
- (3) Sethi, A.; McAuslane, H. J.; Rathinasabapathi, B.; Nuessly, G. S.; Nagata, R. T. Enzyme induction as a possible mechanism for latex-mediated insect resistance in romaine lettuce. *J. Chem. Ecol.* **2009**, *35*, 190–200.
- (4) Agrawal, A. A.; Konno, K. Latex: A model for understanding mechanisms, ecology, and evolution of plant defense against herbivory. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **2009**, *40*, 311–331.
- (5) Rubnov, S.; Kashman, Y.; Rabinowitz, R.; Schlesinger, M.; Mechoulam, R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: Isolation and structure elucidation. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 993–996.
- (6) Gauthier, C.; Legault, J.; Girard-Lalancette, K.; Mshvildadze, V.; Pichette, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2002–2008.
- (7) Lagarda, M. J.; García-Llatas, G.; Farré, R. Analysis of phytosterols in foods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1486–1496.
- (8) Amorin, A.; Borba, H. R.; Carauta, J. P. P.; Lopes, D.; Kaplan, M. A. C. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 255–258.
- (9) Ostlund, R. E. Phytosterols in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **2002**, *22*, 533–549.
- (10) Bouvier, F.; Rahier, A.; Camara, B. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 357–429.
- (11) Piironen, V.; Lindsay, D. G.; Miettinen, T. A.; Toivo, J.; Lampi, A.-M. Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, *80*, 939–966.
- (12) Ohlrogge, J. B. Regulation of fatty acids synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1997**, *48*, 109–136.
- (13) Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 4th ed.; W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA, 1996.
- (14) Gibney, M. J.; Vorster, H. H.; Kok, F. J. *Introduction to Human Nutrition*; Blackwell Science: Oxford, U.K., 2002; pp 100–113.
- (15) Galili, S.; Amir, R.; Galili, G. Genetic engineering of amino acid metabolism in plants. *Adv. Plant Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *1*, 49–80.
- (16) Hounsborne, N.; Hounsborne, B.; Tomos, D.; Edwards-Jones, G. Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *J. Food Sci.* **2008**, *73*, 48–65.
- (17) Oliveira, A. P.; Silva, L. R.; Ferreres, F.; Guedes de Pinho, P.; Valentão, P.; Silva, B. M.; Pereira, J. A.; Andrade, P. B. Chemical assessment and *in vitro* antioxidant capacity of *Ficus carica* latex. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3393–3398.
- (18) Konno, K.; Hirayama, C.; Nakamura, M.; Tateishi, K.; Tamura, Y.; Hattori, M.; Kohno, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: Role of cysteine proteases in latex. *Plant J.* **2004**, *37*, 370–378.
- (19) Mavlonov, G. T.; Ubaidullaeva, K. A.; Rakhmanov, M.; Abdurakhmonov, I. Y.; Abdurakhimov, A. Chitin-binding antifungal protein from *Ficus carica* latex. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 216–219.
- (20) Amorin, A.; Borba, H. R.; Carauta, J. P. P.; Lopes, D.; Kaplan, M. A. C. Anthelmintic activity of the latex of *Ficus* species. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *64*, 255–258.
- (21) Wang, J.; Wang, X.; Jiang, S.; Lin, P.; Zhang, J.; Lu, Y.; Wang, Q.; Xiong, Z.; Wu, Y.; Ren, J.; Yang, H. Cytotoxicity of fig fruit latex against human cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 1025–1033.
- (22) Toivo, J.; Phillips, K.; Lampi, A. -M.; Piironen, V. Determination of sterols in foods: Recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. *J. Food Compos. Anal.* **2001**, *14*, 631–643.
- (23) Sánchez-Machado, D. I.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P.; López-Cervantes, J. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18*, 183–190.
- (24) León-Guzmán, M. F.; Silva, I.; López, M. G. Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Querétaro, México. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 4329–4332.
- (25) Silva, B. M.; Silva, L. R.; Valentão, P.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B.; Trujillo, M. E.; Velázquez, E. HPLC determination of free amino acids profile of Dão red wine: Effect of *Dekkera bruxellensis* contamination. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30*, 1371–1383.
- (26) Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *J. Chromatogr., A* **2003**, *987*, 57–66.
- (27) Jeong, W.-S.; Lachance, P. A. Phytosterols and fatty acids in fig (*Ficus carica* var. Mission) fruit and tree components. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 278–281.
- (28) Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Ashraf-Khorassani, M. Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9436–9445.
- (29) Gül, M. K.; Amar, S. Sterols and the phytosterol content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Cell Mol. Biol.* **2006**, *5*, 71–79.
- (30) Moghadasian, M. H. Pharmacological properties of plant sterols *in vivo* and *in vitro* observations. *Life Sci.* **2000**, *67*, 605–615.
- (31) Fernandes, P.; Cabral, J. M. S. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.* **2007**, *98*, 2335–2350.
- (32) Philips, D. R.; Rasbery, J. M.; Bartel, B.; Matsuda, S. P. T. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 305–314.
- (33) Saleem, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. *Cancer Lett.* **2009**, *285*, 109–115.
- (34) Oliveira, F. A.; Chaves, M. H.; Almeida, F. R. C.; Lima, R. C. P.; Silva, R. M.; Maia, J.; Brito, G. A. A. C.; Santos, F. A.; Rao, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 103–108.
- (35) Samib, A.; Tarua, M.; Salmea, K.; Jari, Y. -K. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *29*, 1–13.
- (36) Liengprayoon, S.; Dubreucq, E.; Sriroth, K.; Bonfils, F.; Vaysse, L. Lipid composition of *Hevea brasiliensis* latex and dry rubber: Characterization and relation with some physical properties. *Proceedings of the CRR and IRRDB International Rubber Conference*; Siem Reap, Cambodia, **2007**; pp 564–577.
- (37) Kitahara, T.; Koyama, N.; Matsuda, J.; Aoyama, Y.; Hirakata, Y.; Kamihira, S.; Kohno, S.; Nakashima, M.; Sasaki, H. Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1321–1326.
- (38) Pande, G.; Akoh, C. C. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chem.* **2010**, *120*, 1067–1075.

- (39) Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, 3rd ed.; Wiley and Sons: Hoboken, NJ, 2004; pp 278–282.
- (40) Vassiliou, E. K.; Gonzalez, A.; Garcia, C.; Tadros, J. H. Chakraborty, G.; Toney, J. H. Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- α both *in vitro* and *in vivo* systems. *Lipids Health Dis.* **2009**, *8*, No. 25.
- (41) Brzozowska, J.; Hanover, P.; Chezeau, R. Free amino acids of *Hevea brasiliensis* latex. *Experientia* **1973**, 894–896.
- (42) Wu, G. Amino acids: Metabolism, functions and nutrition. *Amino Acids* **2009**, *37*, 1–17.
- (43) Şenyuva, H.; Gilbert, J.; Öztürkoğlu, S.; Özcan, S.; Gürel, N. Changes in free amino acid and sugar levels of dried figs during aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 9661–9666.
- (44) Azevedo, R. A.; Arruda, P.; Turner, W. L.; Lea, P. J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 395–419.
- (45) Belitz, H.-D.; Grosch, W. Amino acids, peptides, and proteins. *Food Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1999; pp 8–34.
- (46) Meletis, C. D.; Barker, J. E. Therapeutic uses of aminoacids. *Altern. Complement Ther.* **2005**, *11*, 24–28.
- (47) Herrmann, K. M.; Weaver, L. M. The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 473–503.

Received for review June 10, 2010. Revised manuscript received September 17, 2010. Accepted September 21, 2010. Andreia P. Oliveira is indebted to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for the grant (SFRH/BD/47620/2008) supporting this work.

5.6. Characterization of *Ficus carica* L. cultivars by DNA and secondary metabolites analysis: Is genetic diversity reflected in the chemical composition?

Food Res. Int. (aceite para publicação)

Characterization of *Ficus carica* L. cultivars by DNA and secondary metabolites analysis: Is genetic diversity reflected in the chemical composition?

Andreia P. Oliveira^a, Paula Baptista^b, Paula B. Andrade^a, Fátima Martins^b, José A. Pereira^b, Branca M. Silva^c, Patrícia Valentão^{a,*}

^aREQUIMTE/Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Química, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, nº 228, 4050-313 Porto, Portugal

^bCIMO/School of Agriculture, Polytechnic Institute of Bragança, Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, Bragança, 5301-854, Portugal

^cCICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

* Corresponding author. Tel.: + 351 220428653; fax: +351 226093390.

E-mail address: valentao@ff.up.pt (P. Valentão).

ABSTRACT

Ficus carica L. is one of the first plants cultivated by humans, having a great economic impact in many countries, the fruit being an important constituent of the Mediterranean diet. Plants' metabolome may be influenced by the genetic diversity, environmental factors and their interaction. Thus, in this study we explored the chemical and morphological profiles and the DNA of five Portuguese *F. carica* cultivars, to try to establish a correlation between genetics and metabolome. Morphological and molecular markers of these cultivars were assessed for the first time. Besides the observed morphological differences, *rbcL* chloroplastic DNA region allowed a better clustering of the cultivars and was more successful in the identification of the species; as so, it could be helpful for authenticity purposes. Phenolic compounds and phytosterols profiles were determined by HPLC/DAD, the last revealing to be less variable amongst cultivars, once it was only observed a significant difference in the betulol content of "Pingo de Mel" samples. For almost all the accessions studied, no correlation between genetic diversity and composition was observed.

Keywords: *Ficus carica* L.; Cultivars; Morphology; DNA; Phenolic compounds; Phytosterols

1. Introduction

Ficus carica L. is a gynodioecious species with bisexual trees, characterized by its high capacity to cover several ecological areas and known to be one of the oldest fruit trees cultivated in the Mediterranean region (Ghada et al., 2010). The fruit (fig) has both agricultural and economic impact in many countries, namely in Portugal, where 2946 tons were produced for internal consumption and exportation just in 2010 (INE, 2010). As a seasonal food, fig is an important constituent of the Mediterranean diet, being consumed either fresh or dried, or used for jam production (Lansky, Paavilainen, Pawlus, & Newman, 2008). Additionally, infusions or decocts of fig tree leaves have been traditionally employed in the treatment of tumors and diseases associated with inflammation, in the prevention of nutritional anemia and as anthelmintic (Lansky & Paavilainen, 2009; Meng, Wang, Ji, & Zhong, 1996). Several *F. carica* cultivars are known, some of them being characteristic of certain regions. Nevertheless, their classification is popularly carried out by the observation of the morphological traits of their leaves and fruits, which has a subjective nature somehow.

Chemical and genetic studies have been performed on this species. In a general way, systematic and phylogenetic studies were based on morphological parameters like leaf type, floral morphology and fruit characters, among others (Çalışkan & Polat, 2008). However, most of these parameters are highly influenced by environmental conditions or vary according to the development stage of the plant (Kercher & Systma, 2000). Continuous advances in molecular biology have offered a set of new tools useful to complement the morphological characterization of the species. Recently polymorphism was inferred by sequencing non-coding spacers of the chloroplast and nuclear genomes. The *trnL-trnF* intergenic spacer and the *trnL* (UAA) intron are two regions of chloroplastic

DNA (cpDNA) most sequenced to assess phylogenetic relationships and genetic diversity in *F. carica* cultivars (Ghada et al., 2010). However, other cpDNA regions, such as *rbcL* and the *trnH-psbA* spacer, proposed by some authors as efficient plant DNA barcoding markers, provide huge amounts of information for understanding molecular polymorphism and genome evolution (Chase et al., 1993; Fazekas et al., 2008). The *trnH-psbA* intergenic spacer is one of the most variable non-coding regions of the plastid genome in angiosperms, in terms of having the highest percentages of variable sites and, consequently, is useful to elucidate phylogenetic relationships at the intraspecific level (Kress, Wurdack, Zimmer, Weigt, & Janzen, 2005; Shaw, Lickey, Schilling, & Small, 2007). On the contrary, the *rbcL* region, as well as the other coding sequences of the plastid genome, has been shown to have a lower rate of nucleotide substitutions (Kress et al., 2005; Kress & Erickson, 2007). Nevertheless, in some plant taxa, it provided sufficient information for reconstructions of phylogenetic relationships at the intrageneric level (Kress & Erickson, 2007).

On the other hand, it is well known that the chemical composition has direct effects on the nutritional value and sensory properties of food plants. This may be related with the plant's genetic, environment factors and their interaction (Spanos & Wrolstad, 1992). In this context, some studies were performed to characterize the metabolic composition of several *F. carica* materials (Jeong & Lachance, 2001; Oliveira, Valentão, Pereira, Silva, Tavares, & Andrade, 2009; Oliveira et al., 2010; Teixeira, Patão, Coelho, & Costa, 2006; Valverdú-Queralt, Medina-Remón, Martínez-Huélamo, Jauregui, Andres-Lacueva, & Lamuela-Raventos, 2011; Vaya & Mahmood, 2006).

Phenolics and phytosterols are two classes of secondary metabolites playing several physiological roles in plants, besides being recognized for their antioxidant activity and their capacity to decrease the levels of plasma cholesterol, respectively (Conforti et al.,

2011; Valverdú-Queralt et al., 2011). They contribute to the color and sensory characteristics of fruits and vegetables, and are used as chemical markers (Conforti et al., 2011; Valverdú-Queralt et al., 2011).

The evaluation of the genetic diversity and chemical factors within and among populations is crucial for understanding the adaptive ability of a species and for the development of conservation programs (Mahar, Rana, Ranade, & Meena, 2011). As above mentioned, independent studies of either genetic diversity or chemical profile of *F. carica* have been conducted in recent years, but, to our knowledge, none of the previous works addressed the influence of genetic variability on metabolic composition. Furthermore, the morphologic and genetic characterization, as well as the variation of phytosterols composition of characteristic Portuguese *F. carica* cultivars was not previously assessed. So, the novelty of our manuscript is (i) in the genetic characterization of these widely consumed *F. carica* cultivars, (ii) in the improvement of the knowledge on their chemical composition and (iii) in the establishment of a possible correlation between genetics and metabolic profile. For these purposes we evaluated the morphological traits and analyzed a coding and a non-coding sequence of the plastid genome (*rbcL* and *trnH-psbA*, respectively). Phenolics and phytosterols profiles were determined by HPLC coupled to diode array detector (DAD).

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Leaves from three individuals of five Portuguese *F. carica* cultivars [“Pingo de Mel” (PM1, PM2 and PM3), “Branca Tradicional” (BT1, BT2 and BT3), “Borrasota

Tradicional” (Borr1, Borr2 and Borr3), “Verbera Preta” (VP1, VP2 and VP3) and “Preta Tradicional” (PT1, PT2 and PT3)], were collected from traditional plantations in Mirandela region (Northeast of Portugal), in May 2011. These are the most represented cultivars in this region and are among the most important in Portugal regarding home consumption and export trade. The leaves were collected to sterile plastic bags, immediately placed on ice and transported to the laboratory in insulated sealed ice-boxes, to protect them from heat, air and light exposure. Voucher specimens were deposited at Laboratório de Farmacognosia from Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

2.2. Standards and reagents

All chemicals used were of analytical grade. The standard compounds were purchased from various suppliers: quercetin 3-*O*-rutinoside, bergapten, psoralen, ferulic acid, β -sitosterol, lanosterol, lupeol acetate and betulin were from Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA) and 5-*O*-caffeoylquinic acid and β -amyrin were from Extrasynthèse (Genay, France). Wide range/standard 3:1 agarose, cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 1,4-dithiothreitol (DTT) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); Tris-HCl was obtained from CalBiochem (Darmstadt, Germany); phosphoric acid, methanol, ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 2-mercaptoethanol, ethanol (70% v/v), isopropanol and sodium chloride were from Merck (Darmstadt, Germany); phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v) was from Fluka (Buchs, Switzerland); chloroform:isoamyl alcohol (24:1 v/v) was from Panreac. PCR Buffer (10 mM Tris HCl pH 8.3; 50 mM KCl), $MgCl_2$, deoxyribonucleotide phosphates (dNTP's) were from Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Germany); *Taq* DNA polymerase (GoTaq® Flexi DNA Polymerase) was from Promega (Madison, USA).

Chromabond C18 SPE columns (70 mL / 10000 mg) were purchased from Macherey-Nagel (Duren, Germany). The water was treated in a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.3. Morphological characterization

Six leaf morphological characters, namely length, width, area (leaf length x leaf width), number of lobes and peduncle's length and width, were measured in twenty leaves per genotype.

2.4. DNA extraction, amplification and sequencing

Total genomic DNA was extracted from frozen (-80 °C) leaf tissues, following the method described by Sá et al. (2011). The concentration of obtained DNA was assessed spectrophotometrically at 260 nm and its integrity was checked by gel electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gel (Sambrook, Fritsh, & Maniatis, 1999).

Two plastid regions, the non-coding *trnH-psbA* intergenic spacer and a portion of the coding *rbcL* sequence, were amplified using PCR. The primers used to amplify *trnH-psbA* intergenic spacer were *trnHf* (Tate & Simpson, 2003) and *psbA3'f* (Sang, Crawford, & Stuessy, 1997), whereas *rbcL* sequence was amplified using *rbcLa-F* (Kress & Erickson, 2007) and *rbcLajf634-R* (Fazekas et al., 2008) primers. PCR amplifications were performed in 50 µL total reaction volume containing 5 µL of 5x PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.2 µM of each primer, 10 ng of template DNA and 1 U of *Taq* DNA polymerase. Amplifications were carried out in a Thermocycler Biometra UNO II (Thermoblock, Biotron) using a temperature gradient protocol, as follows: initial

denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 50 °C for 1 min and at 72 °C for 2 min, and a final 10 min extension at 72 °C. PCR amplification products were analyzed by electrophoresis on 1.2% (w/v) agarose gel (Sambrook et al., 1999), and those reactions that amplified a single PCR product were selected for purification using the JETquick PCR product purification kit (Genomed). Amplified fragments were sequenced in both directions at the sequencing services of STAB Vida (Oeiras, Portugal).

2.5. Alignment and sequence analysis

The identity of *trnH-psbA* and *rbcL* obtained sequences was confirmed through BLASTn search (short nearly exact search) in NCBI data base (Altschul et al., 1997). The nucleotide sequences were aligned by the ClustalW method using the MegAlign programme (DNASTAR v.2.58 software) (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) and were further analyzed using MEGA5 software (Tamura, Peterson, Peterson, Stecher, Nei, & Kumar, 2011). For the *trnH-psbA* sequences exhibiting an inversion region, two types of alignment were performed: one utilizing a data matrix with this inversion region and a second one using a data matrix with the inversion replaced by the reverse complement of its sequence. Genetic relationship between *F. carica* cultivars was inferred by the Neighbor-Joining method, which was achieved by using the Maximum Composite Likelihood (MCL) criterion with all positions containing gaps and missing data eliminated from the dataset (complete deletion option). Robustness of the nodes of the phylogenetic tree was assessed by bootstrap percentages computed after 2000 resamplings. *Citrus limon* L. (accession number JN315363) and *Gossypium tomentosum* L. (accession number JN243309) were used in this study as an out-group sequence to root the tree. DnaSP

programme, version 5.00.7 (Librado & Rozas, 2009), was used to estimate the number of variable sites in the DNA sequences (S), the nucleotide diversity (π) (Nei, 1987), the average number of nucleotide differences (K) between cultivars (Tajima, 1983), and to conduct neutrality tests, namely Tajima's D (Tajima, 1989), Fu and Li's D, and Fu and Li's F (Fu & Li, 1993). Tajima's D test compares nucleotide diversity with the number of segregating sites, which are expected to be equal if mutations are selectively neutral. Fu and Li's D statistic is based on differences between the number of singletons (mutations appearing only once among the sequences) and the total number of mutations. Fu and Li's F statistic is based on the differences between the number of singletons and the mean number of nucleotide differences between pairs of sequences. The same software was also used to measure the level of insertion/deletion (indel) polymorphism in both types of regions, by considering all indels events (multiallelic option). For each sequence, length and proportion of guanine/cytosine (GC) contents were determined. The number of base substitutions (transition/transversion) per site, between sequences, was estimated by MEGA5 software (Tamura et al., 2011), using MCL with complete deletion option.

2.6. Phenolic compounds

2.6.1. Extraction

Each sample (ca. 3.0 g) was thoroughly mixed with methanol at 40 °C, until negative reaction to NaOH 20% (w/v) (Oliveira, Pereira, Andrade, Valentão, Seabra, & Silva, 2007). The methanolic extract was filtered, concentrated to dryness under reduced pressure (40 °C) and redissolved in ca. 30 mL of acid water (pH 2 with HCl). The aqueous solution obtained was passed through a SPE C18 column (70 mL volume, 10000 mg adsorbent weight), previously conditioned with 30 mL of methanol and 70 mL of acid

water (pH 2 with HCl). The phenolic fraction retained in the column was then eluted with methanol until negative reaction to NaOH 20% (w/v) (ca. 50 mL) (Oliveira et al., 2007). The extract was evaporated to dryness under reduced pressure (40 °C), redissolved in methanol (6 mL) and 20 µL were analyzed by HPLC/DAD.

2.6.2. HPLC/DAD analysis

The extracts were analyzed on an analytical HPLC unit (Gilson), using a Spherisorb ODS2 (25.0 x 0.46 cm; 5µm, particle size) column, according to a described procedure (Oliveira et al., 2009). The solvent system used was a gradient of water-formic acid (19:1) (A) and methanol (B), starting with 5 % (v/v) methanol and installing a gradient to obtain 15 % B at 3 min, 25 % B at 13 min, 30 % B at 25 min, 35 % B at 35 min, 45 % B at 39 min, 45 % B at 42 min, 50 % B at 44 min, 55 % B at 47 min, 70 % B at 50 min, 75 % B at 56 min and 80 % B at 60 min, at a solvent flow rate of 0.9 mL/min. Detection was achieved with a Gilson diode array detector. Spectral data from all peaks were accumulated in the 200-400 nm range and chromatograms were recorded at 320 and 350 nm. The data were processed on Unipoint[®] software (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France). The compounds in each extract were identified by comparing their retention times and UV-Vis spectra with authentic standards and with the library of spectra previously compiled by the authors. Quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms relative to external standards. The exact procedure is described later in the text (section 3.3.1). Phenolic acids and furanocoumarins were determined at 320 nm and flavonoids at 350 nm. As no 3-*O*-caffeoylquinic acid standard was available, and as it is an isomer of 5-*O*-caffeoylquinic acid, with the same molecular weight and UV spectrum, it was quantified as 5-*O*-caffeoylquinic acid. The other compounds were determined as themselves.

2.7. Phytosterols

2.7.1. Alkaline hydrolysis

Hydrolysis was performed as reported before by Oliveira et al. (2010). Briefly, 1.0 g of each sample was saponified by refluxing with 20 mL of 1 M ethanolic KOH for 1 hour, at constant temperature (80 °C). The mixture was then centrifuged, decanted and transferred to a separation funnel, to extract the unsaponifiable fraction with n-hexane (3 x 10 mL). The organic phase was then evaporated to dryness, the residue was dissolved in methanol (1 mL) and 20 µL were analyzed by HPLC/DAD.

2.7.2. HPLC/DAD analysis

The unsaponifiable fraction was analyzed in a HPLC unit (Gilson), using a reversed phase Hypersil ODS (20 × 0.4 cm i.d. x 5 µm particle size) column, according to Oliveira et al. (2010). The mobile phase was methanol:acetonitrile (30:70, v/v), at a flow rate of 0.8 mL/min, in isocratic mode. Detection was achieved with a Gilson diode array detector. Spectral data from all peaks were accumulated in the 190-400 nm range. The data were processed on Unipoint[®] software (Gilson Medical Electronics, Villiers le Bel, France). Peak purity was checked by the software contrast facilities. Phytosterols were identified by comparison of their retention times and UV absorption spectra with those obtained for authentic standards analyzed under the same conditions. Quantification was achieved by the absorbance recorded in the chromatograms at 205 nm relative to external calibration standards. In addition, the software was able to distinguish the compounds which were not fully separated, integrating them individually and allowing their distinct quantification.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed by using GraphPad Prism software (version 5.02 for Windows). One-way analysis of variance (ANOVA), using the Turkey's multiple comparison test, was carried out on data obtained from triplicate determinations of each sample. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Principal Component Analysis (PCA) was carried out using SPSS 17.0 software (SPSS, Inc. Chicago, Illinois, USA). PCA was applied for reducing the number of variables (6 variables corresponding to each identified phenolic compound and 5 variables corresponding to each identified phytosterol) to a smaller number of new derived variables (principal components, PCs) that adequately summarize the original information, i.e. the five *F. carica* cultivars.

3. Results and discussion

3.1. Morphological analysis

The data obtained for the six morphological characters evaluated are presented in **Table 1**. The results show variations amongst *F. carica* cultivars and between individuals from the same cultivar. Leaf length, leaf width and the number of lobes were the less variable characters, ranging from 11.20 to 27.60 cm, 10.90 to 24.60 cm and from 3 to 7, respectively (**Table 1**). In opposition, peduncle width, peduncle length and foliar area showed larger variations, ranging from 0.30 to 0.80 cm, 3.60 to 13.00 cm and from 124.26 to 605.00 cm², respectively (**Table 1**).

Peduncle length and width and the number of lobes were the only parameters for which no significant difference was found between cultivars (**Table 1**). “Pingo de Mel” and “Verbera Preta” were the most distinct cultivars being distinguished from the others by the leaf width and foliar area, while “Branca Tradicional” differs in the length of the leaves (**Table 1**).

The number of lobes was the only parameter that did not change within each cultivar (**Table 1**). “Branca Tradicional” was the cultivar displaying more differences between its individuals: excepting the number of lobes, significant variations were found for all of the evaluated characteristics (**Table 1**). In contrast, “Pingo de Mel” and “Verbera Preta” were the most constant cultivars, as significant differences among their individuals were just observed for peduncle width (**Table 1**). On the other hand, this parameter and peduncle length did not significantly vary within “Borrasota Tradicional” and “Preta Tradicional” cultivars (**Table 1**). Foliar area was also a constant parameter in the last (**Table 1**).

3.2. Sequences analysis

Both *trnH-psbA* and *rbcL* regions were successfully amplified in all of the *F. carica* cultivars used in this study. In order to confirm the identity of these samples, a BLASTn search was performed using the NCBI database. From the fifteen *trnH-psbA* sequences obtained, 10 allowed the identification to the species level (*F. carica*) with more than 96% of similarity, while the remaining ones exhibited mostly significant alignments with other *Ficus* species, namely with *Ficus bullenei* L. and *Ficus obtusifolia* L. The fifteen *rbcL* sequences obtained in the present study showed 98-100% sequence similarity with *F. carica*. This result indicates that regarding *F. carica* identification the *rbcL* region is more

successful than *trnH-psbA*. In a previous work exploring the utility of four loci (*ITS*, *trnH-psbA*, *rbcL* and *matK*) as DNA barcoding of several *Ficus* species, Roy et al. (2010) obtained different results. Those authors verified that *trnH-psbA* is a better candidate than *rbcL*, since the last one did not work in all of the tested species of the *Ficus* genus. In our study, the inability of *trnH-psbA* to identify *F. carica* species could be due to the low number of this marker sequences available in the GenBank (accession numbers JQ 774235.1, JQ 774245.1, GU 935095.1 and GU 935094.1) for this species comparatively to *rbcL* sequences (accession numbers JQ 064558.1, JQ 064556.1, JQ 064554.1, JQ 064552.1, JQ 064550.1, JQ064542.1, JQ 064540.1, JQ 064536.1 and JQ 064534.1). Some studies have described that the length variability within the *trnH-psbA* spacer could also cause difficulties in the alignment and analysis of this region (Kress et al., 2005). In addition, the presence of inversion regions associated with palindromic sequences within *trnH-psbA* has been found to be a problem if it is used as a marker for DNA barcoding (Whitlock, Hale, & Groff, 2010).

The analysis of the derived sequences showed more variations within *trnH-psbA* region than in *rbcL* region, both in length and in nucleotides contents. The length of *trnH-psbA* region varied from 442 bp in BT2 to 454 bp in PT2 and VP2 cultivars, whereas for *rbcL* region it ranged from 616 bp in VP1 to 636 bp in BT2 cultivar (**Table 2**). Multiple insertions/deletions, i.e., indels, were found in the *trnH-psbA* region: among the 15 analyzed sequences, 32 indels were observed, with an average length of 6.505 bp each. Tajima's D for this data set was -0.774, which was not a significant deviation from the neutral expectation of 0.0, assuming no recombination. Other studies have also shown a high number of indels in the *trnH-psbA* region (Hamilton, Braverman, & Soria-Hernanz, 2003; Kress et al., 2005; Roy et al., 2010). In the *rbcL* region the total number of indels events was lower (28), each showing an average length of 2.148 (**Table 2**). The estimated

value of Tajima's D for this data did not differ significantly from zero. Thus, there is no substantial difference in variation in length within each of the cpDNA regions (442-454 vs 616-636). Furthermore, the number of indels occurring in the non-coding region was similar to that found in the coding one (32 vs 28, respectively).

Similarly, greater differences in nucleotides composition were observed within the *trnH-psbA* intergenic spacer comparatively to the *rbcL* region (**Table 2**). In the first region the GC contents ranged from 24.1% in Borr3 to 35.4% in BT1, whereas in the *rbcL* region this variation was smaller (from 42.1% in BT2 to 43.8% in PT3 cultivar). Among the *trnH-psbA* intergenic spacer higher nucleotide differences, i.e, segregating sites ($S = 128$), nucleotide diversity ($\pi = 0.189$) and mean pairwise sequence differences ($k = 42.05$) were observed compared to those noticed in *rbcL* region ($S = 35$, $\pi = 0.014$, $K = 8.66$). The great level of sequence variation found in the *trnH-psbA* intergenic spacer regions of Portuguese *F. carica* cultivars could be due to the high occurrence of nucleotide substitutions (transition and transversion). The results obtained showed that the overall transition/transversion bias (R) in the *trnH-psbA* intergenic spacer was 2-fold bigger than in the *rbcL* region (**Table 2**), revealing a high rate of substitution in the first cpDNA region. Similarly, the transition/transversion rate ratios (k) were higher in the *trnH-psbA* intergenic spacer [$k_1 = 3.246$ (purines) and $k_2 = 1.919$ (pyrimidines)] than in the *rbcL* sequences [$k_1 = 1.468$ (purines) and $k_2 = 0.102$ (pyrimidines)]. Previous studies have also shown that the *rbcL* coding sequences of the plastid genome have a lower rate of nucleotide substitutions than the non-coding *trnH-psbA* intergenic spacer (Kress & Erickson, 2007; Kress et al., 2005). The *trnH-psbA* intergenic spacer of six *F. carica* individuals, namely BT2, BT3, Borr3, PM3, PT3 and VP3, showed repetitive sequences with 23-24 bp in length and an inversion region of 30-32 bp flanked on both sides by a palindromic sequence of 19-20 bp (**Fig. 1**), which were not noticed in the remaining ones.

This fact, combined with the occurrence of nucleotide substitutions, could also account for the sequences' high variation observed within *trnH-psbA* intergenic spacer region of Portuguese *F. carica* cultivars. When the inversion region was replaced by the reverse complementary sequence in the uniform sequence matrix, the number of variable sites ($S = 126$), nucleotide diversity ($\pi = 0.190$) and the average number of nucleotides differences ($K = 42.34$) were very similar to those obtained with the data matrix with the inversion region. Although intraspecific inversion has rarely been reported, its occurrence in *trnH-psbA* region was previously identified in two species of *Silene* (Štorchová & Olson, 2007), within *Magnolia macrophylla* Michx. (Azuma, Thien, & Kawano, 1999) and in some species of the Gentianaceae family (Whitlock et al., 2010). As far as we know, this is the first report documenting an inversion region in the *trnH-psbA* intergenic spacer of *F. carica*.

Tests of selective neutrality based on the number of segregating sites and nucleotide diversity were used to check whether *F. carica* population has remained stable or has experienced a period of growth. None of the statistics generated from Tajima's D and Fu and Li's F and D tests were significant ($p > 0.10$; **Table 2**), indicating that the hypothesis of selective neutrality, for both cpDNA regions studied, cannot be rejected. This result evidences that *F. carica* population has not experienced a period of growth.

The Neighbor-Joining phenogram derived from the *trnH-psbA* intergenic spacer region organized the several cultivars in two main clusters (**Fig. 2A**). The first cluster is composed by those cultivars exhibiting the repetitive sequences and the inversion region. The remaining cultivars are ranged in the second cluster, where BT1 is significantly divergent from the others. The same pattern was obtained when the inversion region was replaced by the reverse complementary sequence (data not shown). In both data matrix (with the inversion region and with the reverse complement sequence) was observed that,

in general, sequences from the same cultivar did not cluster together. On the contrary, the phenogram based on *rbcL* region allowed a better clustering of *F. carica* cultivars (**Fig. 2B**). In this phenogram, two main clusters can be identified. The first one is composed by the three PT cultivars, two Borr cultivars, PM2 and BT3 cultivars. The second cluster is composed by the three VP cultivars, two BT, PM1 and Borr2 cultivars. Our findings on the use of the *trnH-psbA* intergenic spacer for phylogenetic purposes agree with those reported before (Shaw et al., 2005). The high length variation observed within *trnH-psbA* spacer due to insertions, deletions, and simple sequence repeats, as well as the presence of inverted repeat in some *F. carica* individuals, causes difficulties in the alignment and, thereby, limits its utility in phylogenetic studies.

3.3. Chemical composition

3.3.1. Phenolic compounds

The phenolic compounds present in the methanol extracts of the leaves from five *F. carica* cultivars were identified and quantified by HPLC/DAD. Calibration curves were obtained with standard solutions with five different concentrations, selected as representative of the range of compounds' concentrations in *F. carica* leaves. The calibration plots showed a good correlation, as indicated by coefficient of determination values higher than 0.999 for all compounds (**Table 3**). The limit of detection ($LOD = 3S_0/b$) and the limit of quantification ($LOQ = 10S_0/b$) (where S_0 is the standard deviation of signal-to-noise ratio of a low concentration standard and b is the slope of the calibration plot) for the analyzed phenolic compounds are shown in **Table 3**. In order to study phenolics' recovery, aliquots of 5-*O*-caffeoylquinic acid, quercetin 3-*O*-rutinoside and psoralen standard solutions, at low, medium and high concentrations, were treated as the

sample and quantified by HPLC/DAD, with a recovery of 92.9 – 93.3%, 94.7 – 96.2% and 91.8 – 94.7%, respectively. Repeatability was checked by analyzing the same sample five times, by the same analyst, within the same day; the coefficients of variation were lower than 10% (**Table 3**), indicating that the repeatability of the procedure was good. Additionally, the inter-day precision was determined by analyzing the sample on five different days (five injections a day). The coefficients of variation obtained were always lower than 15%, and the method presented a satisfactory inter-day precision (**Table 3**).

In a general way, the qualitative composition of these extracts revealed to be similar to that of the aqueous lyophilized ones previously described (Oliveira et al., 2009). In all analyzed samples, three hydroxycinnamic acids (3- and 5-*O*-caffeoylquinic acids and ferulic acid), one flavonoid glycoside (quercetin 3-*O*-rutinoside) and two furanocoumarins (psoralen and bergapten) were characterized (**Fig. 3** and **Table 4**). Unlike aqueous extract, which was predominantly composed by quercetin 3-*O*-rutinoside (Oliveira et al., 2009), the methanolic one contains high amounts of psoralen and bergapten, which correspond to ca. 40.3 – 64.0% and 29.6 – 44.3% of total phenolic compounds, respectively (**Table 4**). Psoralen and bergapten contents, as well as the sum of the determined phenolics, in “Pingo de Mel” cultivar are significantly different from those found in the other ones. “Preta Tradicional” is also a distinct cultivar because of its quercetin 3-*O*-rutinoside amounts (**Table 4**).

Significant differences were noticed in the contents of each phenolic compound among the individuals of a same cultivar, with the exception of 5-*O*-caffeoylquinic acid in “Borrasota Tradicional” and “Preta Tradicional” (**Table 4**).

3.3.2. Phytosterols

The qualitative phytosterols profile of the unsaponifiable fraction of the analyzed leaves revealed to be similar to the one previously described for *F. carica* latex (Oliveira et al., 2010). Five compounds were determined in all samples: betulol, lanosterol, lupeol acetate, β -amyrin and β -sitosterol (**Fig. 4**). In order to evaluate the phytosterols recovery, betulol standard solutions, with low, medium and high concentrations, were treated as the sample and quantified by HPLC/DAD, 89.5 – 96.0% being recovered. Lanosterol was always the major compound (ca. 39.9 – 63.9% of total determined phytosterols), unlike what happened with the latex and the leaves of other *F. carica* cultivars, which are predominantly composed by β -sitosterol (Jeong & Lachance, 2001; Oliveira et al., 2010).

In a general way, the phytosterols profile was more constant than the phenolics one, less differences among and within cultivars being noticed. Betulol was the only compound displaying some variation between cultivars: its content on “Pingo de Mel” was significantly lower than that found in the other cultivars (**Table 5**).

Within the same cultivar, β -sitosterol was the less variable compound (**Table 5**). “Verbera Preta” was the most constant cultivar, significant differences being observed only in the betulol content (**Table 5**). In contrast, “Pingo de Mel” was the cultivar that presented more differences, since the amounts of all compounds varied significantly among its individuals (**Table 5**). No significant differences were observed in the lupeol acetate contents within “Branca Tradicional” cultivar, the same being noticed for betulol in “Borrasota Tradicional” and “Preta Tradicional” cultivars (**Table 5**).

3.4. Genetic diversity vs chemical composition

Genetic characterization and chemical composition could be valuable tools to endeavor the analysis of biodiversity in a species. Nevertheless, this relationship is very controversial since some authors reported that genetic variability is reflected on the chemical profile (Morone-Fortunato et al., 2010), whereas others describe the contrary (Hadian, Ebrahimi, Mirjalili, Azizi, Ranjbar, & Friedt, 2011). In order to get more information about phytochemicals variability in all cultivars, a PCA was applied to phenolics and phytosterols data obtained from the 15 *F. carica* individuals. PCA of phenolic compounds revealed that the high quercetin-3-*O*-rutinoside content allows distinguishing “Preta Tradicional” cultivar and that the low phenolic contents, mainly due to small amounts of psoralen and bergapten, allows discriminating “Pingo de Mel” cultivar (**Fig. 5**). On the contrary, PCA of phytosterols showed that these metabolites do not enable a clear separation of any cultivar (data not shown). Thus, the distinction of “Preta Tradicional” cultivar by the *rbcL* plastid region (**Fig. 2B**) and by the phenolic profile (**Table 4** and **Fig. 5**) confirms the correlation existing between genetic diversity and chemical composition.

4. Conclusions

This is the first study concerning the genetic characterization of Portuguese *F. carica* cultivars, worldwide consumed. The morphological analysis showed that “Pingo de Mel” and “Verbera Preta” were the most distinct cultivars. Additionally, the *trnH-psbA* intergenic spacer and the *rbcL* plastid regions were successfully amplified in all *F. carica* cultivars, the first being the most variable. An inversion in the *trnH-psbA* region was

amplified for the first time in some *F. carica* individuals. The *rbcL* region could be a useful tool for authenticity purposes. In a general way, a correlation between genetic diversity and composition was only observed for “Preta Tradicional” cultivar.

Aknowledgments

The authors are grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for grant no. PEst-C/EQB/LA0006/2011, and to the OCTEP–Programa Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal 2007–2013, “Mejora de la competitividad del sector agrario de Castilla y León y Norte de Portugal a través de la innovación y el desarrollo de productos diferenciados de alto valor” for financing the genetic analysis. Andreia P. Oliveira (SFRH/BD/47620/2008) is indebted to FCT for the grant.

References

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Azuma, H., Thien, L. B., & Kawano, S. (1999). Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the floral scents. *Journal of Plant Research*, 112, 291–306.
- Çalışkan, O., & Polat, A. A. (2008). Fruit characteristics of fig cultivars and genotypes grown in Turkey. *Science Horticulturae*, 115, 360–367.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Olmstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B. D., et al. (1993). Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 80, 528–580.
- Conforti, F., Modesto, S., Menichini, F., Statti, G. A., Uzunov, D., Solimene, U., et al. (2011). Correlation between environmental factors, chemical composition, and antioxidative properties of caper species growing wild in Calabria (South Italy). *Chemistry & Biodiversity*, 8, 518–531.
- Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., et al. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS ONE*, 3, e2802. doi:10.1371/journal.pone.0002802.
- Fu, Y. -X., & Li, W. -H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133, 693–709.
- Ghada, B., Ahmed, B. A., Khaled, C., Olfa, S., Messaoud, M., Mokhtar, T., et al. (2010). Molecular evolution of chloroplast DNA in fig (*Ficus carica* L.): Footprints of

- sweep selection and recent expansion. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 563–575.
- Hadian, J., Ebrahimi, S., Mirjalili, M., Azizi, A., Ranjbar, H., & Friedt, W. (2011). Chemical and genetic diversity of *Zataria multiflora* Boiss. accessions growing wild in Iran. *Chemistry & Biodiversity*, 8, 176–188.
- Hamilton, M. B., Braverman, J. M., & Soria-Hernanz, D. F. (2003). Patterns and relative rates of nucleotide and insertion/deletion evolution at six chloroplast intergenic regions in New World species of the Lecythidaceae. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1710–1721.
- INE (2010). Produção de frutos. In *Estatísticas Agrícolas* (pp. 51–53). Lisboa: Instituto Nacional de Estatística.
- Jeong, W.-S., & Lachance, P. A. (2001). Phytosterols and fatty acids in fig (*Ficus carica* var. Mission) fruit and tree components. *Journal of Food Science*, 66, 278–281.
- Kercher, S. M., & Sytsma, K. J. (2000). Genetic and morphological variation in populations of the rare prairie annual *Agalinis skinneuiana* (Wood) Britton (Scrophulariaceae). *Natural Areas Journal*, 20, 166–175.
- Kress, W. J., & Erickson, D. L. (2007). A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE*, 6, e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8369–8374.
- Lansky, E. P., & Paavilainen, H. M. (2009). Leaves. In E. P. Lansky, & H. M. Paavilainen (Eds.), *Figs, the genus Ficus* (pp. 167–207). Boca Raton: CRC Press.

- Lansky, E. P., Paavilainen, H. M., Pawlus, A. D., & Newman, R. A. (2008). *Ficus* spp. (fig): ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 195–213.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.
- Mahar, K. S., Rana, T. S., Ranade, S. A., & Meena, B. (2011). Genetic variability and population structure in *Sapindus emarginatus* Vahl from India. *Gene*, 485, 32–39.
- Meng, Z., Wang, Y., Ji, J., & Zhong, W. (1996). Studies of chemical constituents of *Ficus carica* L. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 27, 202–204.
- Morone-Fortunato, I., Montemurro, C., Ruta, C., Perrini, R., Sabetta, W., Blanco, A., et al. (2010). Essential oils, genetic relationships and *in vitro* establishment of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don ssp. *italicum* from wild Mediterranean germplasm. *Industrial Crops and Products*, 32, 639–649.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Oliveira, A. P., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Valentão, P., Seabra, R. M., & Silva, B. M. (2007). Phenolic profile of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7926–7930.
- Oliveira, A. P., Silva, L. R., Andrade, P. B., Valentão, P., Silva, B. M., Gonçalves, R., et al. (2010). Further insights into the latex metabolite profile of *Ficus carica*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10855–10863.
- Oliveira, A. P., Valentão, P., Pereira, J. A., Silva, B. M., Tavares, F., & Andrade, P. B. (2009). *Ficus carica* L.: Metabolic and biological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2841–2846.
- Roy, S., Tyagi, A., Skula, V., Kumar, A., Singhm, U. M., Chaudhary, L. B., et al. (2010). Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: a case study

- with Indian *Berberis* species. *PLoS ONE*, 5, e13674.
doi:10.1371/journal.pone.0013674.
- Sá, O., Pereira J. A., & Baptista, P. (2011). Optimization of DNA extraction for RAPD and ISSR analysis of *Arbutus unedo* L. leaves. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 4156–4164.
- Sambrook, J., Fritsh, E. F., & Maniatis, T. (1999). *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sang, T., Crawford, D. J., & Stuessy, T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84, 1120–1136.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, J. B., Liu, W., Miller, J., et al. (2005). The tortoise and the hare II: Comparison of the relative utility of 21 non-coding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92, 142–146.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms. The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275-288.
- Spanos, G. A., & Wrolstad, R. E. (1992). Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage - a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1478–1487.
- Štorchová, H., & Olson, M. S. (2007). The architecture of the chloroplast *psbA-trnH* non-coding region in angiosperms. *Plant Systematics and Evolution*, 268, 235–256.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, 437–460.

- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731–2739.
- Tate, J. A., & Simpson, B. B. (2003). Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*, 28, 723–737.
- Teixeira, D. M., Patão, R. F., Coelho, A. V., & Costa, C. T. (2006). Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. *Journal of Chromatography A*, 1103, 22–28.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Martínez-Huélamo, M., Jauregui, O., Andres-Lacueva, C., & Lamuela-Raventos, R. M. (2011). Phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity as chemotaxonomic markers of tomato varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3994–4001.
- Vaya, J., & Mahmood, S. (2006). Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). *BioFactors*, 28, 1–7.
- Whitlock, B. A., Hale, A. M., & Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 5, e11533. doi:10.1371/journal.pone.0011533.

Table 1Morphological characteristics of the leaves from distinct *F. carica* cultivars^a.

Cultivars ^b	Parameters ^c					
	PL (cm)	PW (cm)	LL (cm)	LW (cm)	FA (cm ²)	LN
PM1	6.81 ± 0.45 <i>a</i> (5.70 – 7.70)	0.63 ± 0.08 <i>a</i> (0.50 – 0.70)	22.02 ± 1.96 <i>a</i> (19.40 – 27.60)	20.34 ± 1.80 <i>a</i> (17.80 – 24.60)	450.20 ± 76.12 <i>a</i> (364.72 – 590.40)	3.95 ± 0.89 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
PM2	7.19 ± 0.65 <i>a</i> (5.30 – 8.20)	0.58 ± 0.12 <i>b</i> (0.40 – 0.80)	20.67 ± 2.24 <i>a</i> (16.90 – 23.80)	19.35 ± 1.81 <i>a</i> (16.90 – 23.20)	401.77 ± 69.43 <i>a</i> (287.30 – 524.32)	3.85 ± 0.88 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
PM3	6.71 ± 0.94 <i>a</i> (5.00 – 8.50)	0.55 ± 0.06 <i>b</i> (0.50 – 0.70)	20.49 ± 2.47 <i>a</i> (15.90 – 24.20)	18.87 ± 2.50 <i>a</i> (14.00 – 23.00)	390.75 ± 90.16 <i>a</i> (222.60 – 605.00)	3.75 ± 0.91 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
Mean	6.90 ± 0.68 <i>A</i>	0.58 ± 0.09 <i>A</i>	21.06 ± 2.23 <i>A</i>	19.52 ± 2.04 <i>A</i>	414.24 ± 78.57 <i>A</i>	3.85 ± 0.89 <i>A</i>
BT1	8.28 ± 1.36 <i>a</i> (5.60 – 10.50)	0.49 ± 0.06 <i>a</i> (0.40 – 0.60)	15.90 ± 1.56 <i>a</i> (14.40 – 17.60)	16.12 ± 1.66 <i>a</i> (12.80 – 19.50)	258.07 ± 47.79 <i>b</i> (168.96 – 355.30)	4.85 ± 0.49 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
BT2	6.38 ± 0.99 <i>b</i> (4.10 – 8.90)	0.33 ± 0.05 <i>b</i> (0.30 – 0.40)	13.19 ± 1.39 <i>b</i> (11.20 – 16.40)	12.91 ± 1.28 <i>b</i> (10.90 – 15.50)	171.23 ± 31.10 <i>a</i> (124.26 – 216.00)	4.45 ± 0.76 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
BT3	7.52 ± 1.31 <i>a</i> (5.10 – 10.50)	0.45 ± 0.06 <i>a</i> (0.30 – 0.50)	13.23 ± 0.99 <i>b</i> (11.90 – 15.30)	13.35 ± 1.26 <i>b</i> (10.90 – 16.50)	177.22 ± 26.89 <i>a</i> (152.40 – 238.68)	4.50 ± 0.89 (3.00 – 5.00)
Mean	7.39 ± 1.22 <i>A</i>	0.42 ± 0.06 <i>A</i>	14.10 ± 1.31 <i>B</i>	14.13 ± 1.40 <i>B</i>	202.17 ± 35.26 <i>B</i>	4.60 ± 0.71 <i>A</i>
Borr1	7.48 ± 1.28 <i>a</i> (4.70 – 9.20)	0.45 ± 0.08 <i>a</i> (0.30 – 0.60)	17.08 ± 1.84 <i>a</i> (13.60 – 20.70)	16.71 ± 2.00 <i>a</i> (12.70 – 20.20)	287.85 ± 61.18 <i>a</i> (172.72 – 418.14)	5.40 ± 0.75 <i>a</i> (5.00 – 7.00)
Borr2	7.17 ± 1.41 <i>a</i> (4.00 – 10.40)	0.45 ± 0.07 <i>a</i> (0.30 – 0.50)	16.39 ± 1.32 <i>b</i> (13.00 – 18.80)	15.07 ± 2.03 <i>b</i> (12.10 – 20.20)	252.44 ± 42.45 <i>a</i> (174.20 – 271.44)	5.15 ± 0.09 <i>a</i> (3.00 – 7.00)
Borr3	7.86 ± 1.32 <i>a</i> (4.70 – 10.60)	0.47 ± 0.06 <i>a</i> (0.30 – 0.50)	18.27 ± 1.63 <i>a</i> (13.80 – 20.50)	17.02 ± 1.80 <i>a</i> (14.60 – 20.60)	312.28 ± 52.21 <i>b</i> (202.86 – 409.94)	5.10 ± 1.07 <i>a</i> (3.00 – 7.00)
Mean	7.50 ± 1.34 <i>A</i>	0.46 ± 0.07 <i>A</i>	17.25 ± 1.60 <i>A</i>	16.27 ± 1.94 <i>B</i>	284.19 ± 51.95 <i>B</i>	5.22 ± 0.64 <i>A</i>
PT1	7.03 ± 1.08 <i>a</i> (4.20 – 8.50)	0.49 ± 0.07 <i>a</i> (0.40 – 0.60)	18.42 ± 2.37 <i>a</i> (12.60 – 22.10)	17.05 ± 2.24 <i>a</i> (12.80 – 20.40)	317.77 ± 75.12 <i>a</i> (161.28 – 411.72)	4.65 ± 0.99 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
PT2	6.70 ± 0.87 <i>a</i> (5.40 – 8.50)	0.45 ± 0.07 <i>a</i> (0.30 – 0.50)	17.65 ± 1.64 <i>b</i> (14.20 – 19.80)	15.74 ± 1.61 <i>b</i> (11.90 – 18.20)	279.41 ± 48.74 <i>a</i> (190.40 – 354.42)	4.15 ± 0.88 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
PT3	7.37 ± 0.82 <i>a</i> (6.10 – 8.80)	0.45 ± 0.09 <i>a</i> (0.30 – 0.50)	19.37 ± 1.95 <i>a</i> (14.40 – 22.00)	16.47 ± 1.41 <i>a</i> (13.60 – 18.50)	320.81 ± 53.64 <i>a</i> (195.84 – 395.90)	4.25 ± 0.97 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
Mean	7.03 ± 0.92 <i>A</i>	0.46 ± 0.07 <i>A</i>	18.48 ± 1.99 <i>A</i>	16.42 ± 1.75 <i>B</i>	305.99 ± 59.17 <i>B</i>	4.35 ± 0.95 <i>A</i>
VP1	7.39 ± 1.88 <i>a</i> (4.70 – 10.60)	0.56 ± 0.07 <i>a</i> (0.30 – 0.50)	19.04 ± 2.51 <i>a</i> (13.00 – 18.80)	18.61 ± 2.65 <i>a</i> (12.10 – 20.20)	359.07 ± 88.79 <i>a</i> (174.20 – 271.44)	5.05 ± 0.85 <i>a</i> (3.00 – 7.00)
VP2	7.71 ± 2.07 <i>a</i> (3.60 – 13.00)	0.47 ± 0.07 <i>b</i> (0.30 – 0.60)	18.83 ± 2.51 <i>a</i> (15.00 – 23.00)	18.44 ± 3.19 <i>a</i> (14.50 – 23.60)	352.90 ± 99.55 <i>a</i> (163.68 – 517.50)	4.65 ± 0.75 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
VP3	7.46 ± 1.94 <i>a</i> (4.60 – 10.60)	0.56 ± 0.08 <i>a</i> (0.50 – 0.70)	19.65 ± 1.83 <i>a</i> (15.70 – 22.60)	19.14 ± 2.10 <i>a</i> (15.60 – 24.10)	379.16 ± 73.80 <i>a</i> (244.92 – 544.66)	4.60 ± 0.75 <i>a</i> (3.00 – 5.00)
Mean	7.52 ± 1.96 <i>A</i>	0.53 ± 0.07 <i>A</i>	19.17 ± 2.28 <i>A</i>	18.73 ± 2.65 <i>A</i>	363.71 ± 87.38 <i>A</i>	4.77 ± 0.78 <i>A</i>

^a Values are expressed as mean ± standard deviation, N = 20; the maximum and minimum values are shown in parenthesis; distinct lowercase and uppercase letters in the same column correspond to significant differences ($p < 0.05$) within the same cultivar and amongst cultivars, respectively. ^b PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrásota Tradicional”; PT, “Preta Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; the numbers correspond to different plants. ^c PL, peduncle length; PW, peduncle width; LL, leaf length; LW, leaf width; FA, foliar area (leaf length x leaf width); LN, number of lobes.

Table 2Characteristics of the *trnH-psbA* and *rbcL* sequences of Portuguese *F. carica* cultivars.

	<i>trnH-psbA</i> ^a	<i>rbcL</i>
Nucleotide data		
Sequence length (bp)	442 – 454	616 – 636
GC content (%)	24.1 – 35.4	42.1 – 43.8
Number of variable sites, S	128	35
Nucleotide diversity, π	0.189 \pm 0.028	0.014 \pm 0.006
Average number of nucleotide differences, K	42.05	8.66
Tajima's D	-0.443 ($p > 0.10$)	-1.104 ($p > 0.10$)
Fu and Li's D	-0.856 ($p > 0.10$)	-0.456 ($p > 0.10$)
Fu and Li's F	-0.854 ($p > 0.10$)	-0.733 ($p > 0.10$)
Transition/transversion (R)	0.96	0.39
Indel data		
Total number of indels events	32	28
Indel diversity, ki(i)	8.04	7.31
Average indel length	6.505	2.148
Tajima's D	-0.774 ($p > 0.10$)	-0.631 ($p > 0.10$)

^a Results obtained from the data matrix with the *trnH-psbA* sequences with the inversion region.

Table 3

Validation results for phenolics in *F. carica* leaves by HPLC/DAD analysis.

Phenolics	Regression equation	r^2	Linear range (mg/mL)	LOD ^a (µg/ml)	LOQ ^b (µg/ml)	Intra-day precision (CV%) ^c	Inter-day precision (CV%) ^c
5- <i>O</i> -Caffeoylquinic acid	$Y = 1 \times 10^9 x - 5 \times 10^6$	1.00	0.165 – 0.002	15.09	50.30	8.62	13.49
Ferulic acid	$Y = 3 \times 10^9 x - 2 \times 10^6$	1.00	0.222 – 0.003	2.15	7.16	5.61	6.58
Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside	$Y = 5 \times 10^8 x - 9 \times 10^5$	1.00	0.198 – 0.005	5.91	19.7	2.31	6.15
Psoralen	$Y = 1 \times 10^9 x - 9 \times 10^5$	1.00	0.155 – 0.002	3.22	10.74	4.64	8.89
Bergapten	$Y = 2 \times 10^9 x - 3 \times 10^5$	1.00	0.143 – 0.002	0.52	1.72	5.59	9.14

^a LOD, limit of detection. ^b LOQ, limit of quantification. ^c CV, coefficient of variation.

Table 4

Phenolic composition of the leaves of Portuguese *F. carica* cultivars (mg/Kg fresh weight)^a.

Cultivars ^b	Compounds ^c						Total
	3-CQA	5-CQA	Ferulic acid	Q-3-Rut	Psoralen	Bergapten	
PM1	9.0 ± 0.5 <i>a,A</i>	28.9 ± 0.6 <i>a,A</i>	14.9 ± 0.4 <i>a,A</i>	9.7 ± 0.2 <i>a,A</i>	586.6 ± 6.5 <i>a,A</i>	272.3 ± 4.7 <i>a,A</i>	921.4 <i>a,A</i>
PM2	4.2 ± 0.1 <i>b,A</i>	17.9 ± 0.1 <i>b,A</i>	28.3 ± 1.3 <i>b,A</i>	25.2 ± 0.3 <i>b,A</i>	1817.6 ± 5.8 <i>b,A</i>	1300.3 ± 3.3 <i>b,A</i>	3193.5 <i>b,A</i>
PM3	5.8 ± 0.7 <i>b,A</i>	28.0 ± 0.9 <i>a,A</i>	17.5 ± 0.7 <i>a,A</i>	31.5 ± 1.1 <i>c,A</i>	1230.4 ± 13.9 <i>c,A</i>	685.1 ± 4.6 <i>c,A</i>	1998.4 <i>c,A</i>
BT1	3.1 ± 0.4 <i>a,A</i>	6.3 ± 0.2 <i>a,A</i>	25.8 ± 1.1 <i>a,A</i>	85.0 ± 0.1 <i>a,A</i>	3329.3 ± 13.5 <i>a,B</i>	2674.6 ± 26.8 <i>a,B</i>	6124.1 <i>a,B</i>
BT2	7.7 ± 0.2 <i>b,A</i>	20.3 ± 0.1 <i>b,A</i>	22.8 ± 2.4 <i>a,A</i>	77.2 ± 2.6 <i>a,A</i>	2591.4 ± 29.8 <i>b,B</i>	2164.5 ± 21.3 <i>b,B</i>	4883.8 <i>b,B</i>
BT3	4.7 ± 1.0 <i>a,A</i>	12.5 ± 0.3 <i>c,A</i>	46.4 ± 1.2 <i>b,A</i>	11.5 ± 2.6 <i>b,A</i>	4506.7 ± 52.9 <i>c,B</i>	3633.2 ± 75.0 <i>c,B</i>	8214.9 <i>c,B</i>
Borr1	4.6 ± 0.3 <i>a,A</i>	24.2 ± 0.8 <i>a,A</i>	51.5 ± 0.5 <i>a,A</i>	82.3 ± 1.6 <i>a,A</i>	3086.5 ± 77.2 <i>a,B</i>	2280.2 ± 49.5 <i>a,B</i>	5529.2 <i>a,B</i>
Borr2	16.0 ± 1.7 <i>b,A</i>	23.9 ± 0.4 <i>a,A</i>	28.2 ± 0.3 <i>b,A</i>	61.4 ± 2.4 <i>b,A</i>	2132.6 ± 23.9 <i>b,B</i>	1537.2 ± 43.0 <i>b,B</i>	3799.2 <i>b,B</i>
Borr3	4.6 ± 0.2 <i>a,A</i>	16.2 ± 0.7 <i>a,A</i>	47.9 ± 0.1 <i>a,A</i>	78.9 ± 5.1 <i>a,A</i>	3080.3 ± 4.9 <i>a,B</i>	2503.1 ± 48.4 <i>a,B</i>	5731.0 <i>a,B</i>
PT1	9.2 ± 0.7 <i>a,A</i>	14.2 ± 0.3 <i>a,A</i>	34.0 ± 0.5 <i>a,A</i>	157.2 ± 14.2 <i>a,B</i>	2903.7 ± 13.7 <i>a,B</i>	1421.5 ± 32.7 <i>a,B</i>	4539.8 <i>a,B</i>
PT2	6.6 ± 0.2 <i>b,A</i>	14.0 ± 0.3 <i>a,A</i>	52.1 ± 0.5 <i>b,A</i>	687.3 ± 9.9 <i>b,B</i>	2093.6 ± 58.6 <i>b,B</i>	1051.9 ± 52.7 <i>b,B</i>	3905.5 <i>b,B</i>
PT3	5.1 ± 0.6 <i>b,A</i>	15.8 ± 0.9 <i>a,A</i>	36.4 ± 0.6 <i>a,A</i>	364.4 ± 3.9 <i>c,B</i>	2795.7 ± 43.2 <i>a,B</i>	1297.3 ± 2.4 <i>c,B</i>	4514.6 <i>a,B</i>
VP1	11.6 ± 0.5 <i>a,A</i>	17.8 ± 0.2 <i>a,A</i>	74.2 ± 0.9 <i>a,A</i>	84.4 ± 0.2 <i>a,A</i>	4616.0 ± 56.9 <i>a,B</i>	3241.1 ± 48.1 <i>a,B</i>	8045.1 <i>a,B</i>
VP2	2.0 ± 0.0 <i>b,A</i>	12.0 ± 0.4 <i>b,A</i>	42.6 ± 3.5 <i>b,A</i>	31.3 ± 1.8 <i>b,A</i>	3324.9 ± 86.8 <i>b,B</i>	2214.6 ± 58.5 <i>b,B</i>	5627.4 <i>b,B</i>
VP3	1.0 ± 0.1 <i>b,A</i>	8.1 ± 0.2 <i>c,A</i>	41.8 ± 1.1 <i>b,A</i>	71.6 ± 10.7 <i>a,A</i>	3529.3 ± 83.0 <i>b,B</i>	2280.7 ± 40.2 <i>b,B</i>	5932.5 <i>b,B</i>

^a Values are expressed as mean ± standard deviation of three assays; distinct lowercase and uppercase letters in the same column correspond to significant differences ($p < 0.05$) within the same cultivar and amongst cultivars, respectively. ^b PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; PT, “Preta Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; the numbers correspond to different plants. ^c 3-CQA, 3-*O*-caffeoylquinic acid; 5-CQA, 5-*O*-caffeoylquinic acid; Q-3-Rut, quercetin 3-*O*-rutinoside.

Table 5Phytosterols composition of the leaves of Portuguese *F. carica* cultivars (mg/kg fresh weight)^a.

Cultivars ^b	Compounds					Total
	Betulol	Lanosterol	Lupeol acetate	β -Amyrin	β -Sitosterol	
PM1	178.4 \pm 15.0 <i>a,A</i>	1310.8 \pm 96.1 <i>a,A</i>	277.5 \pm 14.2 <i>a,A</i>	90.2 \pm 5.8 <i>a,A</i>	195.8 \pm 1.2 <i>a,A</i>	2052.7 <i>a,A</i>
PM2	316.3 \pm 8.6 <i>b,A</i>	2117.6 \pm 123.4 <i>b,A</i>	658.6 \pm 25.5 <i>b,A</i>	339.7 \pm 0.3 <i>b,A</i>	446.3 \pm 16.2 <i>b,A</i>	3878.5 <i>b,A</i>
PM3	368.9 \pm 4.0 <i>b,A</i>	2764.2 \pm 164.8 <i>b,A</i>	686.5 \pm 47.2 <i>b,A</i>	368.6 \pm 5.3 <i>c,A</i>	431.5 \pm 26.7 <i>b,A</i>	4619.7 <i>c,A</i>
BT1	675.5 \pm 26.9 <i>a,B</i>	2024.3 \pm 80.8 <i>a,A</i>	566.2 \pm 38.0 <i>a,A</i>	433.9 \pm 11.4 <i>a,A</i>	546.1 \pm 9.2 <i>a,A</i>	4246.0 <i>a,A</i>
BT2	560.9 \pm 35.3 <i>a,B</i>	1168.2 \pm 60.4 <i>b,A</i>	503.8 \pm 32.3 <i>a,A</i>	360.6 \pm 20.9 <i>b,A</i>	330.8 \pm 7.1 <i>b,A</i>	2924.2 <i>b,A</i>
BT3	831.5 \pm 20.1 <i>b,B</i>	2856.2 \pm 28.3 <i>c,A</i>	650.8 \pm 24.7 <i>a,A</i>	532.7 \pm 35.3 <i>c,A</i>	391.4 \pm 9.4 <i>c,A</i>	5262.6 <i>c,A</i>
Borr1	762.6 \pm 45.2 <i>a,B</i>	1790.2 \pm 138.8 <i>a,A</i>	609.3 \pm 9.9 <i>a,A</i>	337.6 \pm 5.8 <i>a,A</i>	296.6 \pm 7.7 <i>a,A</i>	3796.4 <i>a,A</i>
Borr2	604.7 \pm 0.1 <i>a,B</i>	2507.0 \pm 49.3 <i>b,A</i>	793.7 \pm 17.1 <i>b,A</i>	414.5 \pm 11.3 <i>b,A</i>	391.1 \pm 9.6 <i>a,A</i>	4711.0 <i>b,A</i>
Borr3	777.4 \pm 24.9 <i>a,B</i>	2279.4 \pm 120.8 <i>a,A</i>	779.4 \pm 5.0 <i>b,A</i>	386.0 \pm 7.0 <i>c,A</i>	363.6 \pm 26.5 <i>a,A</i>	4585.8 <i>b,A</i>
PT1	692.3 \pm 33.3 <i>a,B</i>	1221.1 \pm 88.7 <i>a,A</i>	572.8 \pm 5.9 <i>a,A</i>	308.0 \pm 10.3 <i>a,A</i>	378.7 \pm 12.6 <i>a,A</i>	3173.0 <i>a,A</i>
PT2	588.4 \pm 38.8 <i>a,B</i>	2179.2 \pm 37.2 <i>b,A</i>	680.9 \pm 0.5 <i>b,A</i>	312.1 \pm 10.3 <i>a,A</i>	445.5 \pm 29.1 <i>a,A</i>	4206.1 <i>b,A</i>
PT3	579.7 \pm 28.5 <i>a,B</i>	1969.3 \pm 67.1 <i>b,A</i>	473.7 \pm 9.9 <i>c,A</i>	220.9 \pm 5.2 <i>b,A</i>	415.1 \pm 25.2 <i>a,A</i>	3658.7 <i>a,A</i>
VP1	690.0 \pm 48.1 <i>a,B</i>	2100.6 \pm 140.0 <i>a,A</i>	696.1 \pm 64.8 <i>a,A</i>	410.9 \pm 5.3 <i>a,A</i>	399.8 \pm 20.6 <i>a,A</i>	4297.5 <i>a,A</i>
VP2	853.3 \pm 7.7 <i>b,B</i>	2243.8 \pm 17.7 <i>a,A</i>	661.9 \pm 58.1 <i>a,A</i>	382.5 \pm 0.5 <i>a,A</i>	336.6 \pm 9.2 <i>a,A</i>	4478.2 <i>a,A</i>
VP3	627.3 \pm 22.9 <i>a,B</i>	2050.5 \pm 157.4 <i>a,A</i>	678.5 \pm 12.5 <i>a,A</i>	404.1 \pm 38.8 <i>a,A</i>	333.2 \pm 26.6 <i>a,A</i>	4093.7 <i>a,A</i>

^a Values are expressed as mean \pm standard deviation of three assays; distinct lowercase and uppercase letters in the same column correspond to significant differences ($p < 0.05$) within the same cultivar and amongst cultivars, respectively. ^b PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; PT, “Preta Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; the numbers correspond to different plants.

Fig. 1. Alignment of partial *trnH-psbA* spacer region showing repetitive sequences of 23-24 bp (gray box) and an inversion region of 30-32 bp (dark gray box) flanked by inverted repeats of 19-20 bp (arrows). PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; PT, “Preta Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; the numbers correspond to different plants.

Fig. 2. Neighbor-Joining trees resulting from the *trnH-psbA* intergenic spacer sequences (A) and from the *rbcL* sequences (B). The *trnH-psbA* sequences with the inversion region are noted with an asterisk. Bootstrap values $\geq 50\%$ are given in branches.

Fig. 3. HPLC/DAD chromatogram of phenolic compounds of *F. carica* leaves (detection at 320 nm). Peaks: (1) 3-*O*-caffeoylquinic acid; (2) 5-*O*-caffeoylquinic acid; (3) ferulic acid; (4) quercetin 3-*O*-rutinoside; (5) psoralen and (6) bergapten.

Fig. 4. HPLC/DAD chromatogram of phytosterols of *F. carica* leaves extract hydrolysed with KOH 1M (detection at 205 nm). Peaks: (1) betulol, (2) lanosterol, (3) lupeol acetate, (4) β -amyrin and (5) β -sitosterol.

Fig. 5. Projection of phenolic compounds (variables: 3-CQA, 3-*O*-caffeoylquinic acid; 5-CQA, 5-*O*-caffeoylquinic acid; ferulic acid; Q-3-Rut, quercetin 3-*O*-rutinoside; psoralen; bergapten) and cultivars (variables: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; PT, “Preta Tradicional”; VP, “Verbera Preta”) into the plane composed by the principal components PC1 and PC2 containing 79.09% of the total variance.

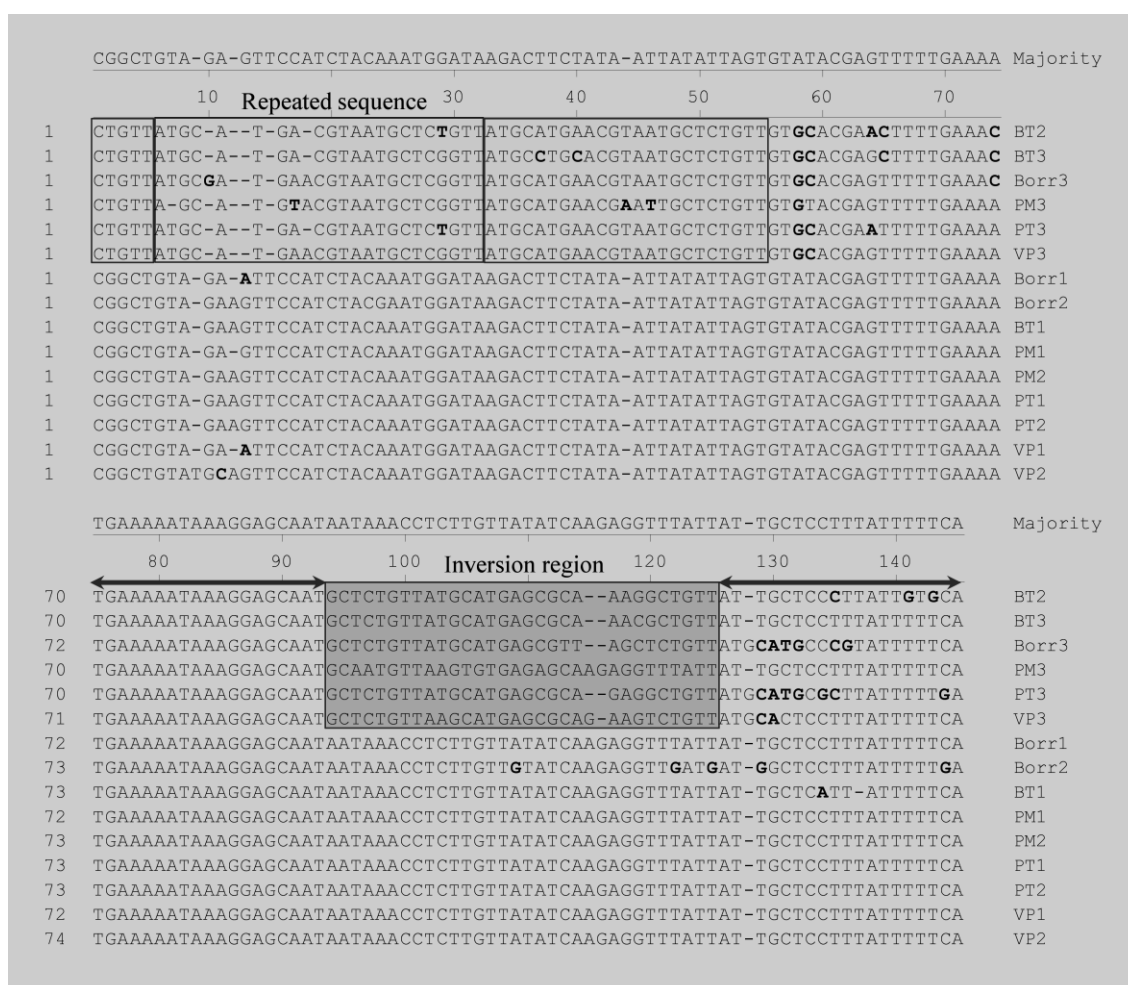


Fig. 1.

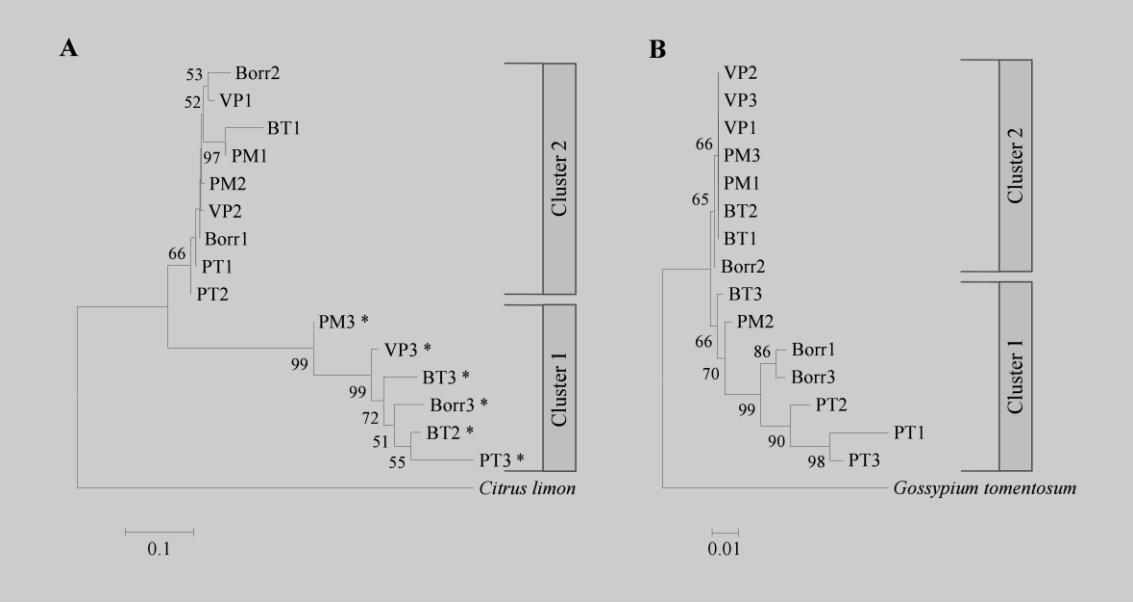


Fig. 2.

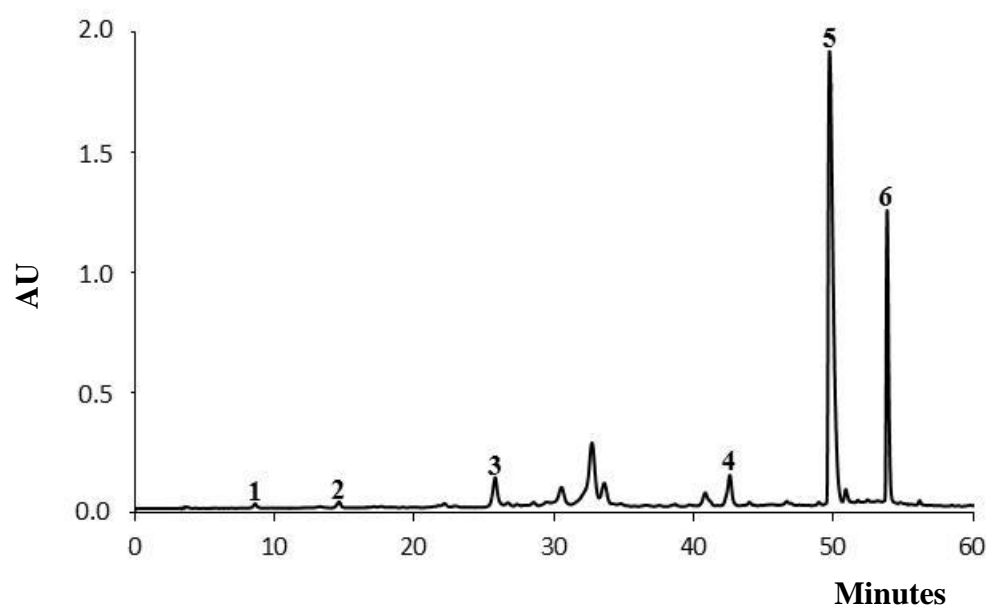


Fig. 3.

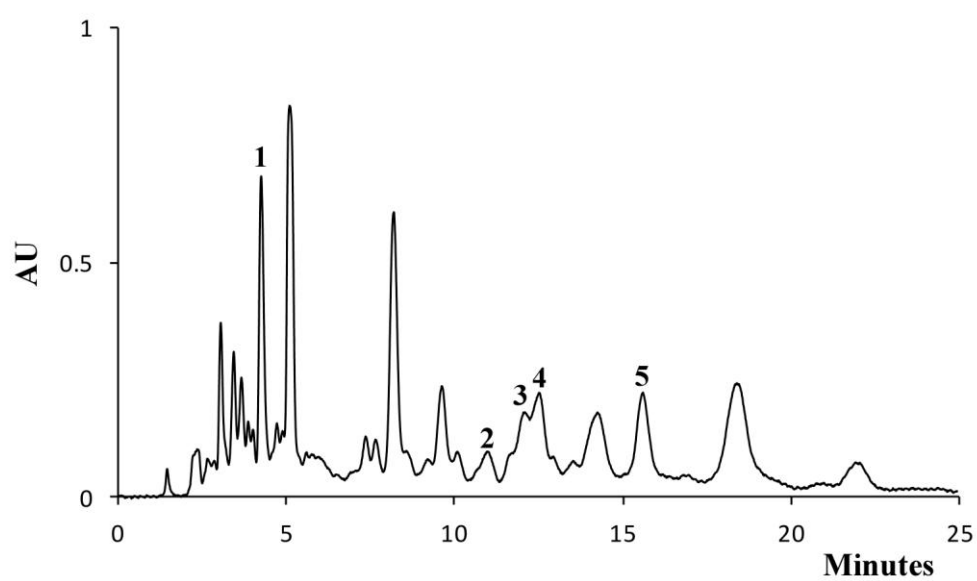


Fig. 4.

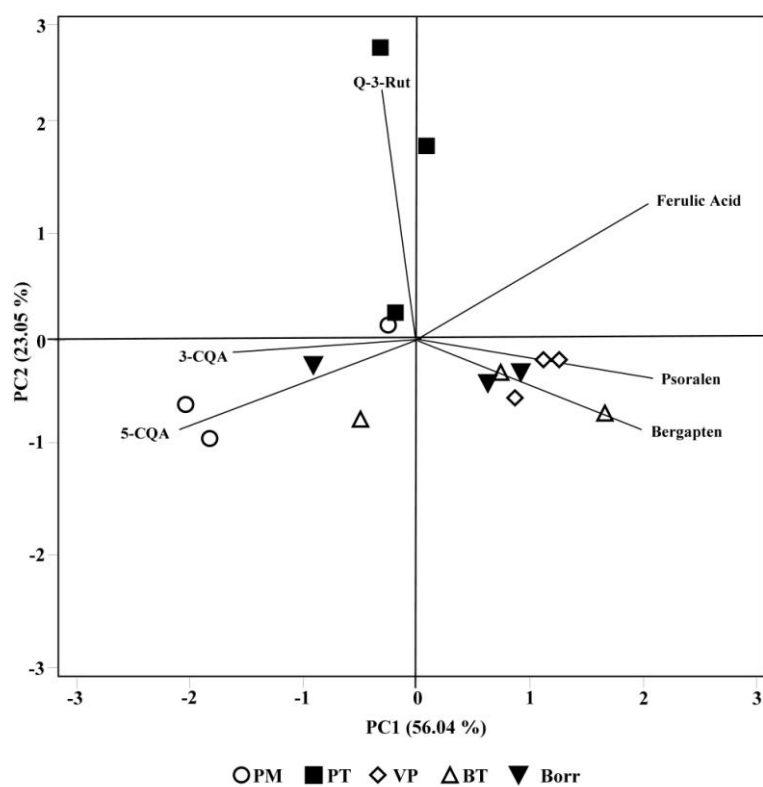


Fig. 5.

5.7. Análise do perfil fenólico do látex por HPLC-DAD-MS

Para a caracterização dos compostos fenólicos do látex de *F. carica* da cultivar “Pingo de Mel”, uma amostra foi diluída com água ultra-pura (50:50), filtrada e analisada por HPLC-DAD-MS.

5.7.1. Condições analíticas

A análise por HPLC-DAD-MS obedeceu às seguintes condições:

- O sistema de HPLC estava equipado com um detetor de díodos (G1315B) e um detetor de massa (G2445A) em série, era constituído por uma bomba binária (G1312A), um injetor automático (G1313A) e um desgaseificador (G1322A) e controlado pelo software ChemStation (Agilent, v. 08.03). O detetor de massa (G2445A) estava equipado com um sistema de ionização por eletrospray (ESI), controlado pelo software LCMSD (Agilent, v. 4.1.);
- O nitrogénio foi usado como gás nebulizador, à pressão de 65 psi e com um fluxo de 11 L/min;
- A temperatura do capilar e a voltagem foram mantidas a 350 °C e 4 kV, respetivamente;
- O hélio foi usado como gás de colisão, com ciclos de voltagem de 0,3 até 2 V;
- A coluna LiChroCART (25,0 x 0,40 cm; 5 µm, diâmetro de partícula) estava protegida com pré-coluna LiChroCART (0,04 x 0,04 cm);
- O sistema eluente era composto por água:ácido fórmico (1%) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min - 10% B, 30 min – 25% B, 40 min – 80% B; Fluxo: 1 mL/min;
- Volume de injeção: 20 µL;
- Os dados espectrais de todos os picos cromatográficos foram adquiridos entre 200 e 400 nm e os cromatogramas obtidos foram registados a 280 e 330 nm.
- Os espectros de massa foram registados na gama de m/z 100-2000 e nos modos de ionização negativo e positivo.

5.8. Avaliação de efeitos celulares

De modo a avaliar a citotoxicidade das folhas e frutos de *F. carica* foram testados extratos obtidos com diferentes solventes orgânicos (metanol e acetato de etilo) e um extrato aquoso, os quais foram caracterizados em termos de composição fenólica. Foram usadas culturas de fibroblastos de pulmão de hamster (células V79) e de células neuronais obtidas de neuroblastoma humano (células SH-SY5Y).

5.8.1. Substâncias de referência e reagentes

Os padrões de quercetina-3-O-rutinósido, bergapteno, psoraleno e de ácido ferúlico foram obtidos da Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA) e o ácido 5-O-cafeoilquínico da Extrasynthèse (Genay, France). O ácido fosfórico e o metanol foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Germany). O dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), dinucleótido de β -nicotinamida e adenina na forma reduzida (NADH) e o piruvato de sódio foram obtidos da Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os reagentes utilizados para a cultura celular foram adquiridos à Invitrogen (Gibco, USA): meio de cultura DMEM (meio de Eagle modificado por Dubelco), tampão fosfato salino (PBS), tripsina/EDTA 0,25%, penicilina (5,000 U/mL)/estreptomicina (5 μ g/mL), solução contendo cada aminoácido não essencial numa concentração de 10 mM e soro bovino fetal (FBS).

5.8.2. Preparação dos extratos

Foram realizadas duas extrações independentes utilizando 5 x 50 mL de metanol ou acetato de etilo, sob agitação (200 rpm), e cerca de 10 g de amostra liofilizada. O material foi extraído até reação negativa com NaOH a 20%. Cada uma das soluções extrativas foi filtrada e levada à secura, sob pressão reduzida, à temperatura de 40 °C. O resíduo foi redissolvido em 25 mL de água ácida (pH 2 com HCl) e a solução aquosa resultante foi purificada por SPE (C₁₈) [colunas Chromabond® com 70 ml de reservatório e 10000 mg de adsorvente (Macherey-Angel)]. As colunas foram previamente acondicionadas com 30 mL de metanol e 70 mL de água ácida. Procedeu-se à aplicação da amostra e os compostos fenólicos retidos na coluna foram depois eluídos com metanol, até reação negativa com NaOH a 20%. O extrato metanólico recolhido foi evaporado à secura, a pressão reduzida, à temperatura de 40 °C.

Para a preparação do extrato aquoso, cerca de 2 g de amostra liofilizada foram extraídas com 500 mL de água fervente, durante 15 min. O extrato aquoso foi filtrado e submetido a liofilização (Labconco Freezone 4,5).

5.8.3. Análise por HPLC-DAD

Os extratos orgânicos foram redissolvidos em 2 mL de metanol LiChrosolv e o extrato aquoso liofilizado (1,5 mg) foi redissolvido em 1 mL de água ultra-pura.

A análise dos compostos fenólicos obedeceu às seguintes condições:

- O sistema HPLC (Gilson) estava equipado com duas bombas 321, injetor Rheodyne (modelo 7125), acoplado a um detetor de díodos (Gilson);
- Coluna: Spherisorb ODS2 (25,0 x 0,46 cm; 5 µm, diâmetro de partícula);
- Sistema eluente: água:ácido fórmico (19:1) (solvente A) e metanol (solvente B);
- Gradiente: 0 min - 5% B, 3 min – 15% B, 13 min – 25% B, 25 min – 30% B, 35 min – 35% B, 39 min – 45% B, 42 min – 45% B, 44 min – 50% B, 47 min – 55% B, 50 min – 70% B, 56 min – 75% B, 60 min – 80% B; Fluxo: 0,9 mL/min;
- Volume de injeção: 20 µL.

Os cromatogramas foram registados a 280, 320 e 350 nm, e os diferentes compostos fenólicos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e espectros de UV/vis, no intervalo de comprimentos de onda 200-400 nm, com os de substâncias de referência. A quantificação dos ácidos fenólicos e furanocumarinas foi efetuada a 320 nm e a dos flavonoides a 350 nm.

5.8.4. Cultura celular

As culturas celulares foram desenvolvidas até confluência em frascos de 75 cm² contendo DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 2% de penicilina e 1% de solução contendo cada aminoácido não essencial numa concentração de 10 mM e mantidas numa estufa a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂. As células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS), tratadas com solução de 0,25% de tripsina/EDTA, centrifugadas (5 min a 4000 rpm) e subcultivadas em placas de culturas de 96 poços, numa densidade de 5x10⁴ células/poço. Quando as células atingiram o estado de confluência, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. Os

extratos metanólico e de acetato de etilo foram redissolvidos em DMSO e diluídos em meio nas concentrações apropriadas (até 0,5% v/v de DMSO). Para determinar o efeito na viabilidade celular, os extratos foram adicionados a cada poço e incubados durante 24 horas.

5.8.4.1. Determinação da viabilidade celular

Os ensaios mais utilizados para determinar a viabilidade celular são a redução do MTT e a determinação da lactato desidrogenase (LDH) extracelular, que fornecem informação sobre a atividade mitocondrial e a integridade membranar, respetivamente.

5.8.4.1.1. Ensaio do MTT

A viabilidade celular foi avaliada pela determinação da redução do MTT a formazano, como previamente descrito (246). Após o período de incubação o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas durante 30 minutos, a 37 °C, com meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL). Terminado este tempo, a solução foi removida e os cristais de formazano foram solubilizados pela adição de 250 µL de DMSO. A viabilidade celular foi determinada pela medição espectrofotométrica do formazano a 570 nm. Os resultados são apresentados como a percentagem de redução do MTT das células tratadas relativamente ao controlo. Foram realizados quatro ensaios independentes, em triplicado.

5.8.4.1.2. Determinação da LDH

Após as 24 horas de incubação, uma alíquota (50 µL) de meio de cultura foi retirada e misturada com NADH (0,15 mg/mL) e uma solução tamponada de piruvato (pH 7,4). A atividade da LDH foi avaliada pela conversão de NADH a NAD⁺, determinada espectrofotometricamente a 340 nm (247). Os resultados são apresentados como a percentagem de enzima libertada relativamente ao controlo. Foram realizados quatro ensaios independentes, em triplicado.

5.8.4.2. Genotoxicidade

5.8.4.2.1. Ensaio do Cometa

As células pré-tratadas (durante 24h) com os extratos aquosos de folhas de *F. carica*, cultivar “Pingo de Mel”, foram expostas a 250 nM de rotenona durante 2 h. Depois de tripsinizadas foram colhidas e a viabilidade foi avaliada pelo método de exclusão do azul de tripano, sendo sempre superior a 95%. Cerca de 5×10^4 células foram diluídas em agarose (de baixo ponto de fusão) dissolvidas em PBS (37 °C, pH 7,4) e espalhadas em lâminas pré-mergulhadas em agarose a 1% (ponto de fusão normal). As lâminas foram mantidas a -4 °C até solidificação do gel de agarose. Após solidificação, as lâminas foram imersas numa solução de lise durante 1 h, sendo posteriormente colocadas numa tina de eletroforese horizontal contendo uma solução alcalina (pH 13), onde permaneceram durante 20 minutos ao abrigo da luz. Seguidamente procedeu-se à eletroforese, durante 20 min a 30 V e 300 mA (1 V/ cm). As lâminas foram depois lavadas com uma solução de neutralização. Posteriormente procedeu-se à coloração das células com uma solução de brometo de etídeo (20 µg/mL). Cada amostra foi preparada em duplicado. Os cometas obtidos foram analisados com o software Comet Assay IV. Para avaliar o dano provocado no DNA, o parâmetro escolhido foi a intensidade da cauda do cometa observado (248, 249).

PARTE III

DISCUSSÃO INTEGRADA E CONCLUSÕES

6. DISCUSSÃO INTEGRADA

6.1. Perfil metabólico de *F. carica*

Como foi referido anteriormente, as plantas possuem uma grande diversidade de metabolitos, os quais, para além de terem um papel preponderante na sua sobrevivência no ecossistema, apresentam diversos efeitos biológicos.

Nas secções seguintes serão discutidos os resultados obtidos no estudo fitoquímico e do potencial biológico de diversos materiais (folhas, cascas, polpas e látex) de cinco cultivares Portuguesas de *F. carica* (“Pingo de Mel”, “Branca Tradicional”, “Verbera Preta”, “Borrasota Tradicional” e “Preta Tradicional”). Relativamente ao látex, importa chamar a atenção para o facto de se tratar de uma matriz muito escassa e de recolha difícil, pelo que o estudo foi realizado unicamente na cultivar “Pingo de Mel” por ser a mais consumida em Portugal.

6.1.1. Ácidos orgânicos

A quantidade de ácidos orgânicos presentes nas plantas depende de vários fatores, como o tipo de fixação de carbono, a atividade catabólica, o estado nutricional, a idade da planta e do tipo de tecido (26). Face à importância desta classe de compostos para as características organoléticas e para o potencial antioxidante, procedeu-se à determinação dos ácidos orgânicos presentes nos extratos aquosos das folhas, cascas e polpas de duas cultivares brancas de *F. carica* (“Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”), assim como no látex da cultivar “Pingo de Mel”. Foram identificados seis compostos: os ácidos oxálico, cítrico, málico, quínico, xiquímico e fumárico [(5.1, 5.4), (73, 103)]. Relativamente a estes metabolitos, um estudo anterior referiu a presença dos ácidos oxálico, cítrico, málico e fumárico no fruto (36). Os ácidos quínico e xiquímico foram identificados pela primeira vez em *F. carica*.

Foram observadas algumas diferenças qualitativas e quantitativas entre os diferentes materiais vegetais e entre cultivares [(5.1, 5.4), (73, 103)] (Tabela 13 e Figuras 24 e 25).

Em termos qualitativos, é possível verificar que, apesar da maioria dos ácidos orgânicos identificados ser comum a todas as matrizes, o ácido quínico aparece exclusivamente nas folhas e látex, permitindo distinguir estes materiais (Tabela 13).

Tabela 13. Ácidos orgânicos encontrados em *F. carica*.

Material vegetal	Ácido oxálico	Ácido cítrico	Ácido málico	Ácido quínico	Ácido xiquímico	Ácido fumárico
Folhas	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cascas do fruto	✓	✓	✓		✓	✓
Polpas do fruto	✓	✓	✓		✓	✓
Látex	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Relativamente à folha e fruto, as maiores diferenças são observadas a nível quantitativo, tendo-se verificado que nas folhas e cascas do fruto de ambas as cultivares, bem como nas polpas da cultivar “Branca Tradicional”, alguns destes metabolitos se encontravam em quantidades vestigiais, o que impediu a sua quantificação. Em termos de material vegetal, as cascas são aquele que é mais influenciado pela cultivar, notando-se grandes diferenças entre as duas analisadas (Figura 24).

De modo geral, os resultados obtidos mostram que o material vegetal com maior teor destes metabolitos é a folha, sendo a cultivar “Pingo de Mel” a mais rica (37259,9 mg/Kg), o que pode ser explicado pela maior quantidade de ácidos málico e quínico verificadas nesta cultivar. Todas as outras matrizes possuem quantidades consideravelmente menores destes compostos, sendo a polpa da cultivar “Branca Tradicional” a matriz mais pobre (5840,4 mg/Kg) [(5.1, 5.4), (73, 103)].

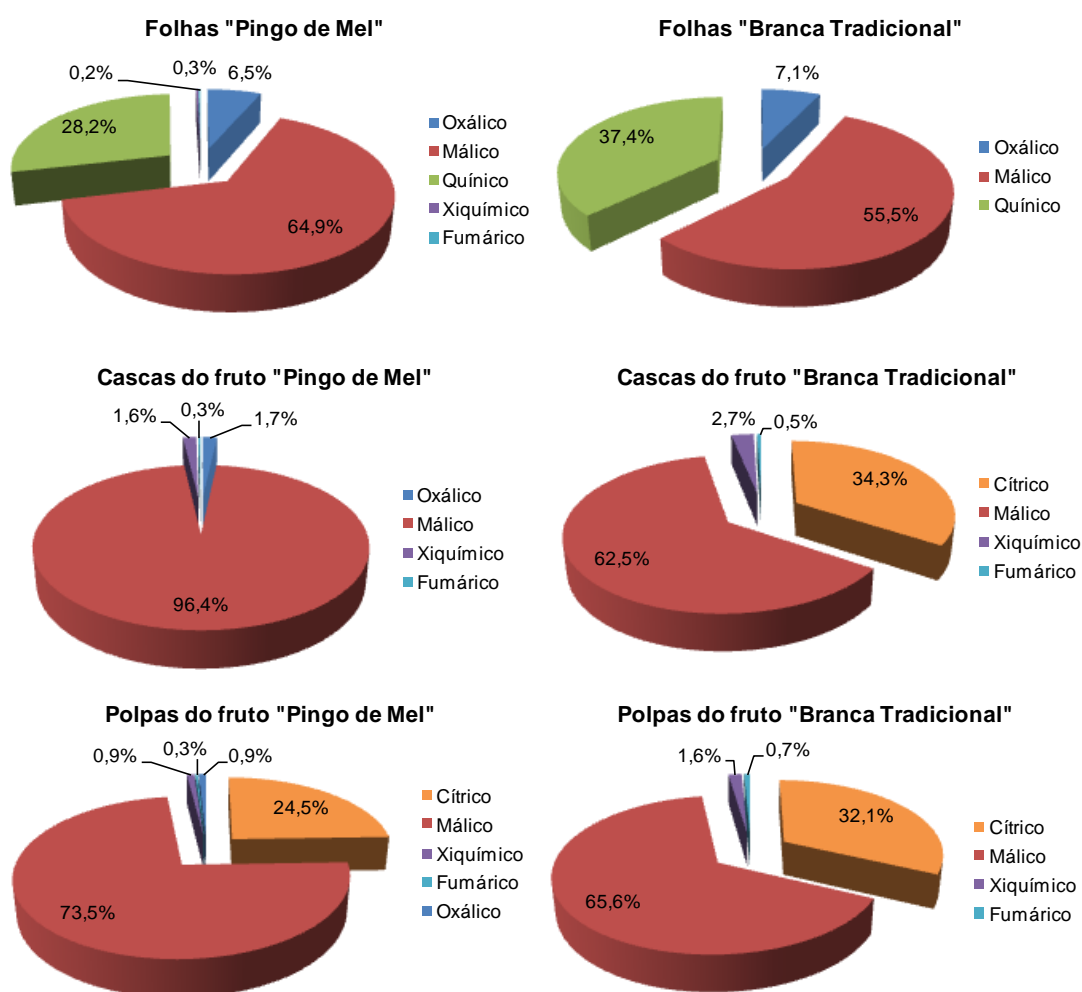


Figura 24. Ácidos orgânicos na folha e fruto (cascas e polpas) de duas cultivares brancas de *F. carica* ("Pingo de Mel" e "Branca Tradicional").

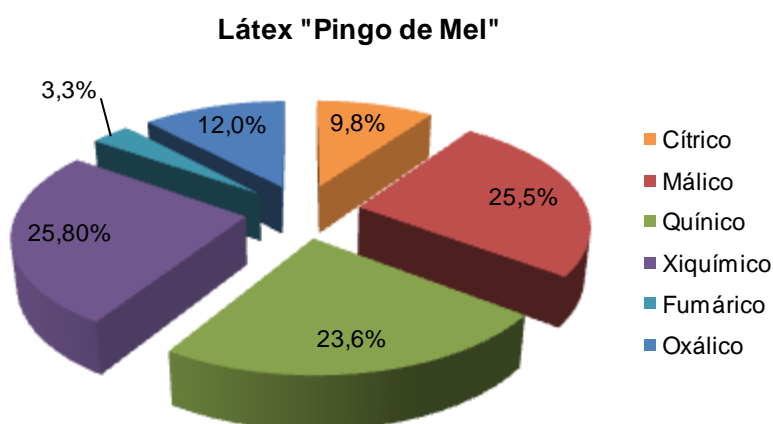


Figura 25. Ácidos orgânicos no látex da cultivar "Pingo de Mel".

As diferentes matrizes são caracterizadas pela presença de grandes quantidades de ácido málico, o qual representa mais de 55% dos ácidos orgânicos identificados em todas as amostras de folha e fruto (Figura 24). Este ácido está diretamente envolvido no ciclo de Krebs (produtor de energia) e a sua concentração está relacionada com o estado de maturação dos frutos e plantas (250-252). Para além disso, o ácido málico mantém o pH citosólico e atua como agente osmótico e antagonizador dos iões potássio e sódio (253-255).

Nas folhas, o ácido quínico está presente em quantidades consideravelmente superiores à encontrada no látex (Figuras 24 e 25). O ácido quínico é um constituinte comum nas plantas (26). Este composto constitui, juntamente com o ácido xiquímico, um intermediário essencial na biossíntese dos aminoácidos aromáticos nos sistemas vivos e suporta nutricionalmente a síntese de triptofano e nicotinamida no trato gastrointestinal dos humanos (27). Adicionalmente, estes dois ácidos orgânicos são precursores de compostos fenólicos e, de modo geral, as espécies que contêm grandes quantidades de ácido quínico caracterizam-se por apresentarem baixas quantidades de ácido xiquímico. Na realidade, o ácido quínico é essencialmente acumulado nas plantas angiospérmicas enquanto o xiquímico existe preferencialmente nas gimnospérmicas (256).

Nas polpas e nas cascas dos frutos da cultivar “Branca Tradicional”, o ácido cítrico é o segundo principal composto, representando mais de 24% dos compostos identificados (Figura 24). O ácido cítrico é conhecido pela sua atividade antioxidante e desempenha um papel importante no transporte de longa distância para as folhas através do xilema, bem como na translocação de ferro nas raízes (257).

Aplicando uma análise de componentes principais (PCA) aos teores de cada ácido orgânico nas folhas e frutos, verifica-se uma clara discriminação entre os diferentes materiais de ambas as cultivares (Figura 26), o que comprova a existência de diferenças significativas entre o conteúdo de cada composto. Tal como referido, as polpas e as cascas dos frutos da cultivar “Branca Tradicional” são as matrizes com teores superiores de ácido cítrico, o que justifica a sua nítida separação dos outros materiais no plano formado pelos eixos PC1 negativo e PC2 positivo. O elevado conteúdo em ácidos quínico e málico presente nas folhas da cultivar “Pingo de Mel” possibilita a sua separação dos outros materiais, incluindo das folhas da cultivar “Branca Tradicional”.

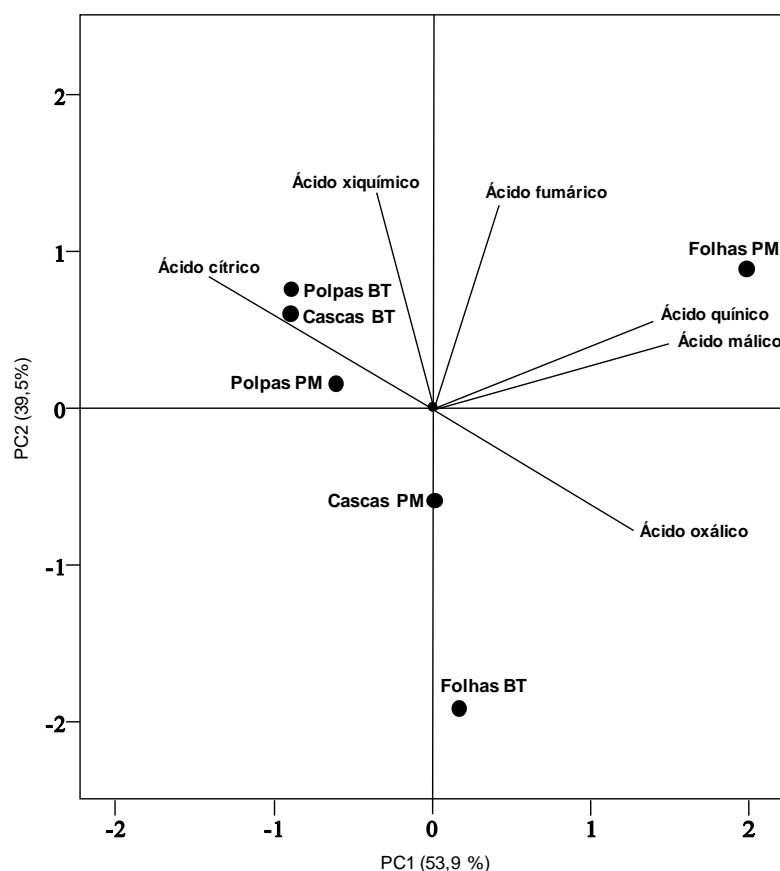


Figura 26. Diagrama de componentes principais do conteúdo de ácidos orgânicos em folhas e frutos (casca e polpa) de *F. carica* (mg/Kg). As componentes principais 1 e 2 representam 93,4% da variância total. PM, cultivar “Pingo de Mel”; BT, cultivar “Branca Tradicional”.

No que diz respeito ao látex, apesar do perfil qualitativo ser semelhante ao do extrato liofilizado das folhas (Tabela 13), este foi o material que apresentou o teor mais reduzido de ácidos orgânicos (3172,3 mg/Kg) [5.4, (103)]. Isto poderá ser explicado pelo facto de, ao contrário das outras, para as quais a extração foi feita com água a 100 °C, os ácidos orgânicos desta matriz terem sido determinados na amostra acidificada com ácido sulfúrico à temperatura ambiente. Como estes metabolitos são solúveis em solventes polares, o uso de água, associado à temperatura mais elevada, facilitará a sua extração. No entanto, é preciso ter em conta que a quantidade reduzida destes metabolitos pode constituir uma característica deste material vegetal.

Contrariamente ao verificado para os tecidos vegetais, este produto de secreção é caracterizado por possuir quantidades consideráveis de ácido xiquímico (> 25% do conteúdo total) (Figura 25).

Aplicando a PCA ao teor de cada metabolito nos diferentes tecidos vegetais e no produto de secreção da mesma cultivar verifica-se uma clara discriminação de todos os materiais, o que confirma a existência de diferenças no conteúdo de cada um deles. O elevado teor de ácido xiquímico observado no látex possibilita a sua separação nítida dos outros materiais, no plano formado pelos eixos negativos da PC1 e PC2 (Figura 27).

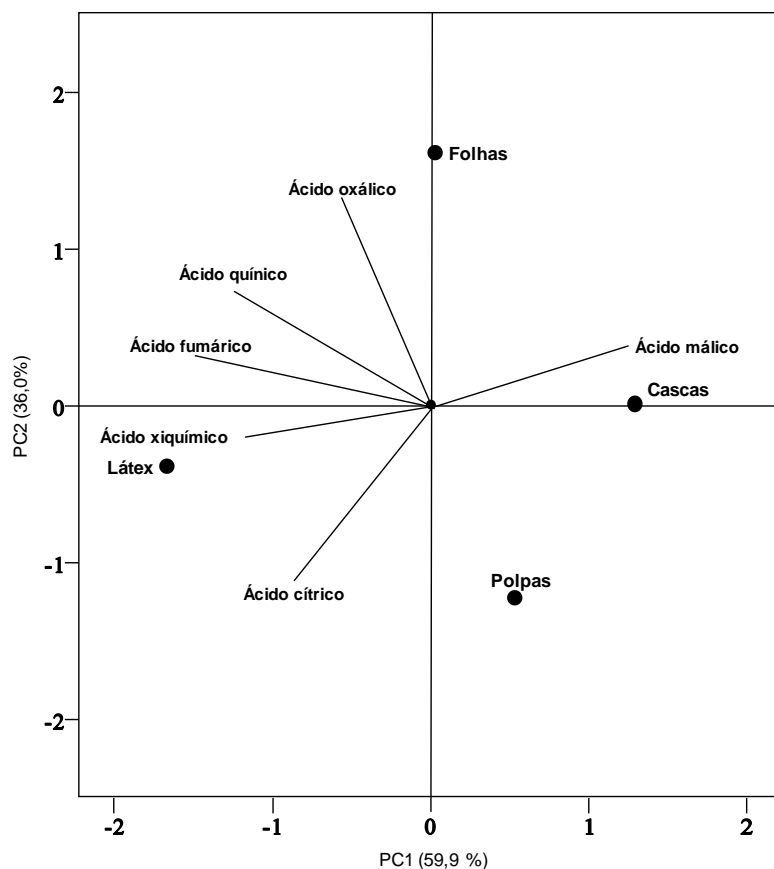


Figura 27. Diagrama de componentes principais aplicado ao conteúdo em ácidos orgânicos das folhas, frutos (casca e polpa) e látex da cultivar “Pingo de Mel” (mg/Kg). As componentes principais 1 e 2 representam 95,9% da variância total.

6.1.2. Ácidos gordos

De modo a incrementar o conhecimento do metaboloma do látex de *F. carica*, procedeu-se à determinação do seu perfil de ácidos gordos, tendo-se verificado que esta matriz é constituída essencialmente por ácidos gordos saturados, os quais correspondem a 86,4% dos ácidos gordos totais. Relativamente aos compostos identificados, os ácidos pentadecanóico (C15:0), heptadecanóico (C17:0), *cis*-10-heptadecenóico (C17:1), heneicosanóico (C21:0), tricosanóico (C23:0) e lignocérico (C24:0) foram descritos pela primeira vez em *F. carica* [5.5, (111)].

Analisando o perfil quantitativo observa-se que o látex apresenta quantidades reduzidas de ácidos gordos, sendo o seu conteúdo total de 182,25 mg/Kg. Os ácidos araquídico (C20:0) e palmítico (C16:0) são os mais abundantes (Figura 28). A presença do ácido C17:1 em quantidades vestigiais impediu a sua quantificação.

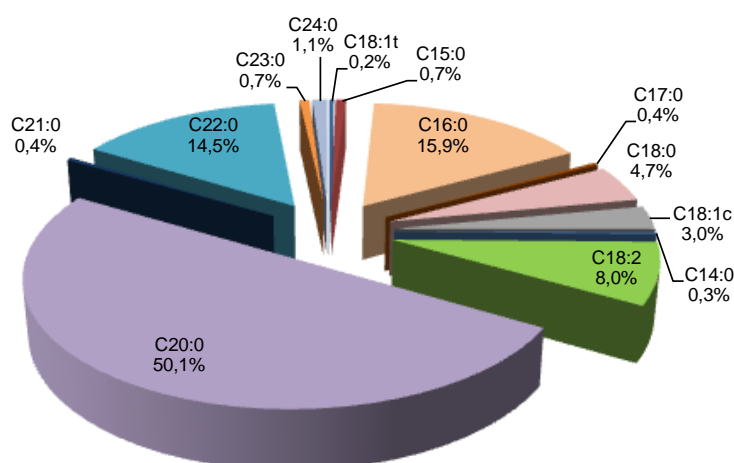


Figura 28. Composição em ácidos gordos do látex da cultivar “Pingo de Mel”. C14:0, Ácido mirístico; C15:0, ácido pentadecanóico; C16:0, ácido palmítico; C17:0, ácido heptadecanóico; C18:0, ácido esteárico; C18:1c, ácido oleico; C18:1t, ácido elaídico; C18:2, ácido linoleico; C20:0, ácido araquídico; C21:0, ácido heneicosanóico, C22:0, ácido beénico; C23:0, ácido tricosanóico; C24:0, ácido lignocérico.

Conforme referido atrás, o látex de *F. carica* é constituído maioritariamente por ácidos gordos saturados. Contrariamente, nos frutos frescos e secos verifica-se uma predominância de ácidos gordos insaturados, os quais correspondem a 69,1 e 84,0% do conteúdo total de ácidos gordos, respetivamente (59, 60), sendo os primeiros constituídos essencialmente pelo ácido linoleico (28,2%), e os segundos pelo ácido α -linolénico (53,1%).

Entre os ácidos gordos insaturados, presentes em pequena quantidade no látex de *F. carica*, os ácidos linoleico e oleico são os maioritários e podem desempenhar funções importantes, principalmente a nível da defesa (258-260).

6.1.3. Aminoácidos

No seguimento da caracterização de metabolitos primários do látex, procedeu-se à determinação do seu perfil de aminoácidos [5.5, (111)]. Foram identificados por HPLC-UV treze compostos: 5 aminoácidos essenciais (leucina, triptofano, fenilalanina, lisina e histidina) e 8 não essenciais (asparagina, alanina, glutamina, serina, glicina, ornitina, tirosina e cisteína), os quais tinham sido descritos anteriormente em frutos secos (45).

O estudo do perfil quantitativo revelou que o teor de aminoácidos é muito baixo (7,2 mg/g), sendo o látex constituído essencialmente por aminoácidos não essenciais (73,2% do total de compostos identificados). A cisteína e a tirosina são os mais abundantes, representando 50,8 e 41,3% do conteúdo total de aminoácidos não essenciais, respetivamente. Relativamente aos aminoácidos essenciais, o triptofano é claramente o maioritário (93,0% do total de aminoácidos essenciais) (Figura 29). A glicina e alanina foram os compostos minoritários (Figura 29).

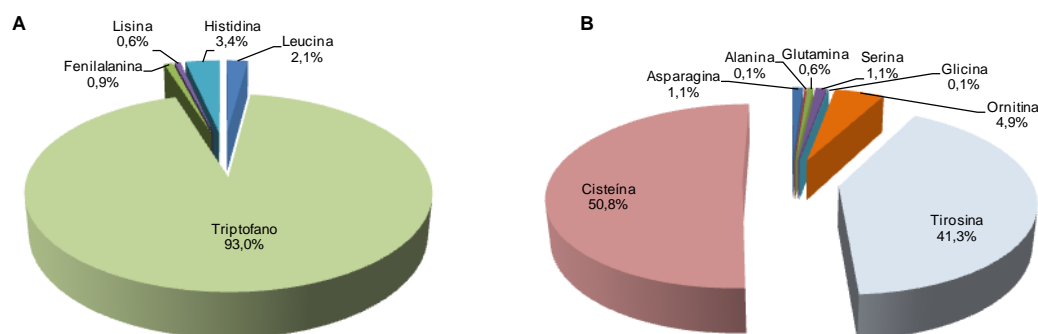


Figura 29. Perfil de aminoácidos essenciais (A) e não essenciais (B) do látex de *F. carica*.

No látex de *F. carica* encontrou-se lisina, asparagina e glutamina, compostos que são formados a partir de outros aminoácidos. Como foi referido anteriormente, a lisina e a asparagina são formadas a partir do ácido aspártico, que também dá origem à metionina e à treonina. Por outro lado, a glutamina é produzida através do ácido glutâmico, que também é precursor da prolina e da arginina (41). Assim, pode-se inferir que os compostos detetados no látex são produtos da conversão total de seus precursores, uma vez que estes não foram encontrados.

Apesar do conteúdo em aminoácidos desta matriz ser relativamente baixo, a extração e pré-concentração destes compostos pode ser útil para a sua incorporação em formulações orais e/ou para aplicação tópica.

6.1.4. Compostos fenólicos

No âmbito desta dissertação procedeu-se também à quantificação dos compostos fenólicos em extratos aquosos de vários materiais de duas cultivares brancas (“Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”) de *F. carica*. Como o método extrativo afeta não só o tipo de compostos que é extraído, mas também a quantidade em que cada um deles é extraído, este procedimento permitiu determinar os compostos fenólicos disponíveis na forma habitual de consumo das folhas, isto é, como infusão. Além dos extratos aquosos, foram também estudados extratos metanólicos das folhas das duas cultivares brancas e de três tintas (“Borrasota Tradicional”, “Verbera Preta” e “Preta Tradicional”), para aumentar a possibilidade de determinar outros compostos fenólicos, bem como do látex da cultivar “Pingo de Mel”. Adicionalmente, procedeu-se à caracterização de dois tipos de extratos de

folhas, cascas e polpas dos frutos da cultivar “Pingo de Mel” obtidos com solventes orgânicos (metanólico e de acetato de etilo) para posterior avaliação dos seus efeitos a nível celular.

6.1.4.1. Folha e fruto

6.1.4.1.1. Extratos aquosos

Nos extratos aquosos liofilizados foram identificados três ácidos hidroxicinâmicos (ácidos 3-*O*-cafeoilquínico, 5-*O*-cafeoilquínico e ferúlico), dois heterósidos de flavonóis (quercetina-3-*O*-glucósido e quercetina-3-*O*-rutinósido) e duas furanocumarinas (psoraleno e bergapteno). Estudos anteriores referiram a presença de ácido 5-*O*-cafeoilquínico e de quercetina-3-*O*-rutinósido nas folhas e nos frutos, de ácido ferúlico, psoraleno e de bergapteno nas folhas de *F. carica* (124, 126, 127). Neste trabalho foi descrita pela primeira vez a ocorrência de ácido 3-*O*-cafeoilquínico e de quercetina-3-*O*-glucósido nesta espécie, bem como a presença de psoraleno e bergapteno nos frutos e de ácido ferúlico nas cascas [5.1, (73)].

Tal como verificado para os ácidos orgânicos, a análise das diversas matrizes permitiu verificar que, de modo geral, o perfil qualitativo é semelhante, sendo a polpa aquela que apresenta menor diversidade de compostos fenólicos (Tabela 14).

Tabela 14. Compostos fenólicos encontrados nas folhas e frutos de duas cultivares brancas de *F. carica*^a.

Material	3-CQA	5-CQA	Ácido ferúlico	Q-3-Glu	Q-3-Rut	Psoraleno	Bergapteno
Folhas “PM”		✓	✓	✓	✓	✓	✓
Folhas “BT”	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cascas “PM”	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Cascas “BT”	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Polpas “PM”		✓		✓	✓	✓	✓
Polpas “BT”	✓	✓		✓	✓	✓	✓

^a 3-CQA, Ácido 3-O-cafeoilquínico; 5-CQA, ácido 5-O-cafeoilquínico; Q-3-Glu, quercetina-3-O-glucósido; Q-3-Rut, quercetina-3-O-rutinósido; “PM”, cultivar “Pingo de Mel”; “BT”, cultivar “Branca Tradicional”.

O estudo do perfil quantitativo revelou diferenças entre os vários materiais; contudo, entre cultivares, e para o mesmo material, essas diferenças não foram tão acentuadas. Em algumas matrizes, principalmente na polpa da cultivar “Pingo de Mel”, a presença de alguns destes metabolitos em quantidades vestigiais impediu a sua quantificação. Os resultados obtidos permitem observar que as folhas de ambas as cultivares apresentam o conteúdo mais elevado de compostos fenólicos, o qual variou entre 32412,0 e 34473,7 mg/Kg. Já as polpas apresentaram o teor mais reduzido, contendo entre 36,6 e 130,2 mg/Kg de compostos fenólicos.

De modo geral, os flavonoides predominam sobre os ácidos hidroxicinâmicos e furanocumarinas (Figura 30). Por exemplo, o teor de flavonoides nas cascas dos frutos da cultivar “Branca Tradicional” é cerca de 37 vezes superior ao de ácidos hidroxicinâmicos e nas cascas dos frutos da cultivar “Pingo de Mel” é cerca de 204 vezes superior ao de furanocumarinas (Figura 30). Por outro lado, na polpa da cultivar “Pingo de Mel” só foram quantificados dois compostos fenólicos: um éster do ácido cafeico e do ácido quínico, o ácido 5-O-cafeoilquínico, o qual representa 90% dos compostos identificados, e uma furanocumarina, o psoraleno (Figura 30).

De facto, as folhas apresentam um conteúdo fenólico superior ao dos frutos, o que não é de estranhar, uma vez que as folhas, para além de protegerem os frutos das radiações UV, têm um papel fundamental na fotossíntese, convertendo a energia solar em energia química (glucose e ATP), captando dióxido de carbono e produzindo oxigénio. Posteriormente, a glucose pode ser utilizada na produção de vários metabolitos (polissacarídeos, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outros), de acordo com as necessidades da planta. Assim sendo, é das folhas que se faz a distribuição dos nutrientes para todas as outras partes da árvore. Adicionalmente, como os compostos fenólicos, nomeadamente os flavonoides, são acumulados nas células da epiderme é de esperar que, nos frutos, o conteúdo fenólico das cascas seja superior ao das polpas (261).

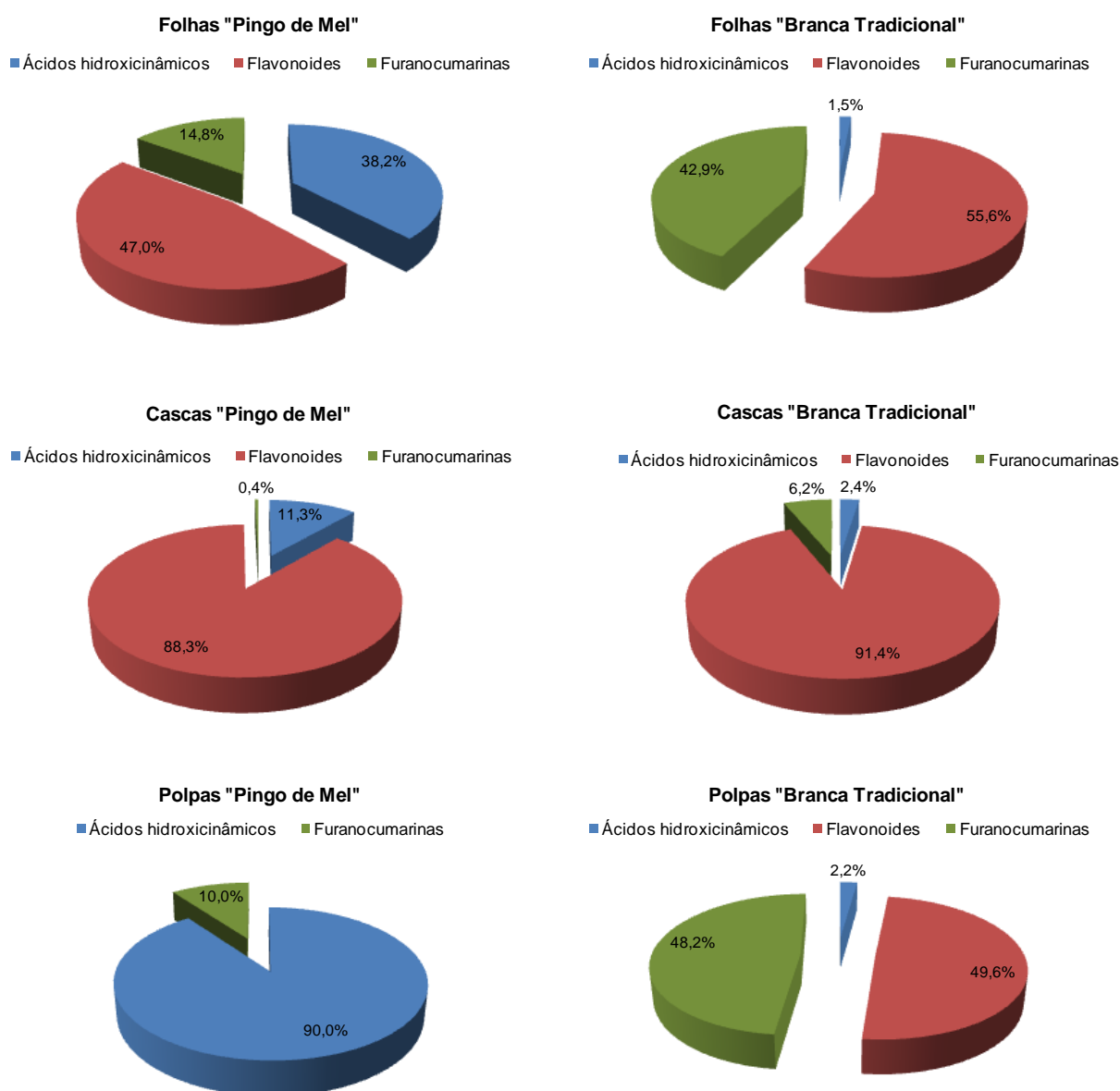


Figura 30. Derivados de ácidos hidroxicinâmicos, flavonoides e furanocumarinas nas folhas e frutos (casca e polpa) de duas cultivares brancas de *F. carica*.

Da análise individual das diferentes matrizes é possível verificar que, de uma forma geral, a quercetina-3-O-rutinósido é o constituinte principal de todas amostras, representando entre 42,3% (folhas “Pingo de Mel”) e 87,1% (cascas “Branca Tradicional”) dos compostos fenólicos determinados, exceto nas polpas da cultivar “Pingo de Mel”, onde este metabolito está presente em quantidades vestigiais.

É de realçar o conteúdo de ácido 5-O-cafeoilquínico nas folhas, o qual é cerca de 26 a 57 vezes superior ao das cascas. Tal facto não é de estranhar, uma vez que o ácido

quínico só está presente nas folhas. Na realidade, o conteúdo de ácido quínico nas folhas de ambas as cultivares é cerca de 10 vezes superior ao conteúdo de ácido 5-O-cafeoilquínico. Na biossíntese dos ácidos cafeoilquínicos, a enzima hidroxicinamoiltransferase (HCT) promove a esterificação do ácido quínico com o ácido *p*-cumárico ativado com coenzima A (CoASH). O resíduo *p*-cumaroilo pode posteriormente ser modificado, dando origem a outros ácidos hidroxicinâmicos. Por exemplo, a enzima *p*-cumarato 3-hidroxilase (C3H) cataliza a formação de ácido 3-O-cafeoilquínico a partir de ácido 3-O-*p*-cumaroilquínico (262) (Figura 31).

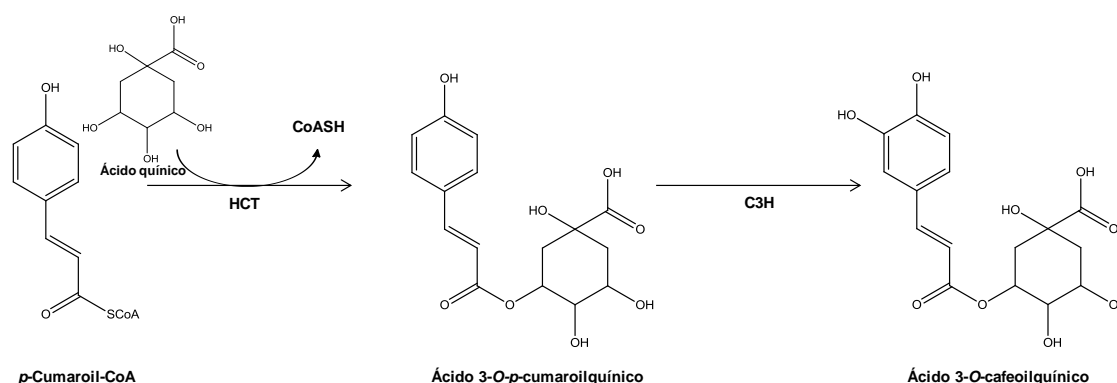


Figura 31. Biossíntese dos ácidos clorogênicos. HCT, hidroxicinamoiltransferase; C3H, *p*-cumarato 3-hidroxilase e CoASH, coenzima A [adaptada de (262)].

A composição fenólica pode ser utilizada na discriminação de cultivares e, dentro de cada uma delas, na distinção de tecidos vegetais. Com esta finalidade, aplicou-se uma PCA ao teor de cada composto fenólico (Figura 32). As duas PCs, PC1 e PC2, são responsáveis por 92,2% da variabilidade total e confirmam a existência de diferenças significativas entre os conteúdos dos diferentes compostos. O conteúdo elevado dos ácidos 5-O-cafeoilquínico e ferúlico, bem como de quercetina-3-O-glucósido, verificado nas folhas da cultivar “Pingo de Mel” possibilita a sua separação das restantes matrizes. Do mesmo modo, as folhas da cultivar “Branca Tradicional” distinguem-se pelas quantidades superiores de furanocumarinas e de quercetina-3-O-rutinósido. Contrariamente, as cascas dos frutos de “Pingo de Mel” são distintas devido ao seu conteúdo em ácido 3-O-cafeoilquínico. Já as cascas dos frutos de “Branca Tradicional” e as polpas de ambas as cultivares são posicionadas no plano formado pelos eixos negativos de ambas as PCs devido ao baixo teor da maioria dos compostos identificados.

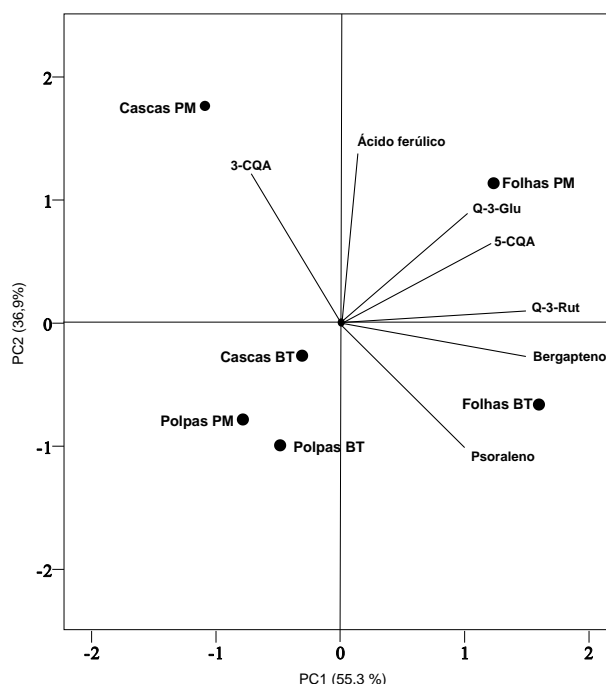


Figura 32. Diagrama de componentes principais do conteúdo de compostos fenólicos das amostras analisadas (mg/Kg). As componentes principais 1 e 2 representam 92,2% da variância total. 3-CQA, Ácido 3-O-cafeoilquínico; 5-CQA, ácido 5-O-cafeoilquínico; Q-3-Glu, quercetina-3-O-glucósido; Q-3-Rut, quercetina-3-O-rutinósido; PM, cultivar “Pingo de Mel”; BT, cultivar “Branca Tradicional”.

6.1.4.1.2. Extratos de solventes orgânicos

O perfil dos compostos fenólicos tem sido utilizado a nível taxonómico na identificação de espécies, em estudos comparativos e na avaliação da autenticidade de produtos alimentares. A biossíntese e a variedade destes compostos nas plantas são influenciadas por numerosos fatores, incluindo fatores genéticos e ambientais: a disponibilidade de água e a composição do solo têm um efeito marcante no conteúdo fenólico das plantas e na sua aptidão para sofrerem escurecimento ou outras desordens associadas aos compostos fenólicos (263). A intensidade da luz, origem geográfica e a posição na árvore também exercem um efeito importante no metabolismo fenólico (71). Estes fatores influenciam a qualidade nutricional dos alimentos e os possíveis efeitos benéficos nos consumidores (264).

Assim, de modo a avaliar em que medida a diversidade genética se reflete na composição fenólica procedeu-se à quantificação destes metabolitos nos extratos metanólicos das folhas frescas das cinco cultivares [5.6, (123)]. O perfil qualitativo dos extratos metanólicos é semelhante ao dos extratos aquosos [5.1, (73)], tendo sido

identificados por HPLC-DAD três ácidos hidroxicinâmicos (ácidos 3- e 5-O-cafeoilquínico e ácido ferúlico), um heterósido de flavonol (quercetina-3-O-rutinósido) e duas furanocumarinas (psoraleno e bergapteno).

Comparando os valores obtidos para os extratos aquosos [5.1, (73)] com os encontrados nos extratos metanólicos das mesmas cultivares [5.6, (123)] pode-se concluir que a quantidade de compostos fenólicos é significativamente mais baixa nos segundos, o que pode ser em parte explicado pela presença de grandes quantidades de flavonoides glicosilados nos extratos aquosos, uma vez que estes compostos apresentam maior solubilidade em água (265).

Os extratos metanólicos das folhas das diferentes cultivares apresentam o mesmo perfil qualitativo; contudo, observam-se diferenças a nível quantitativo, tendo o conteúdo fenólico total variado entre 921,4 mg/Kg e 8241,9 mg/Kg. As cultivares “Branca Tradicional” e “Verbera Preta” são as que apresentam maiores quantidades destes compostos.

De realçar que, contrariamente ao verificado para os extratos aquosos, os quais eram predominantemente constituídos por flavonoides, nos extratos metanólicos observam-se grandes quantidades de furanocumarinas, nomeadamente de psoraleno e bergapteno (Figura 32), correspondendo a 53 - 64% e 27 - 44% do conteúdo total de compostos fenólicos, respetivamente. Os derivados do ácido cafeoilquínico (ácidos 3- e 5-O-cafeoilquínico) estão presentes em menores quantidades, representando 0,02 - 0,98% e 0,1 - 3,1%, respetivamente. Tendo em conta os resultados obtidos, é possível verificar que as furanocumarinas foram os compostos mais constantes entre as diferentes cultivares.

Foi também possível observar que dentro da mesma cultivar, existem diferenças no teor de cada composto fenólico (Figura 33). Tal facto pode estar relacionado com a localização geográfica da árvore e com a própria posição das folhas na planta, uma vez que, como estes compostos funcionam como filtros das radiações UV, quanto maior for a exposição solar maior é a sua produção (261).

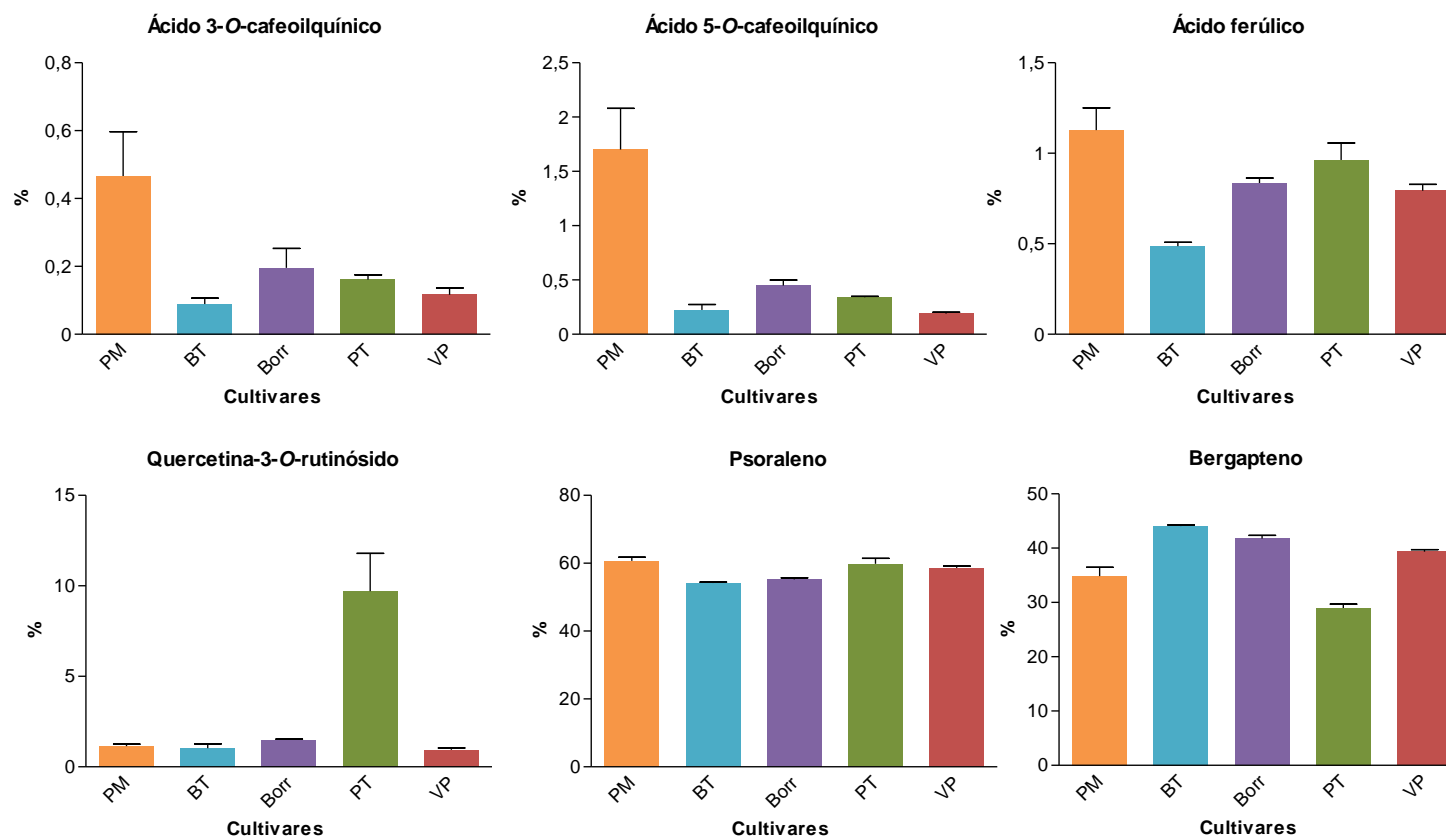


Figura 33. Composição fenólica dos extratos metanólicos das folhas de diferentes cultivares de *F. carica*: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 indivíduos analisados em triplicado.

Nos extratos de folhas e frutos (cascas e polpas) liofilizados da cultivar “Pingo de Mel” preparados com metanol e acetato de etilo foram determinados 6 e 2 compostos, respectivamente (Figura 34 e Tabela 15).

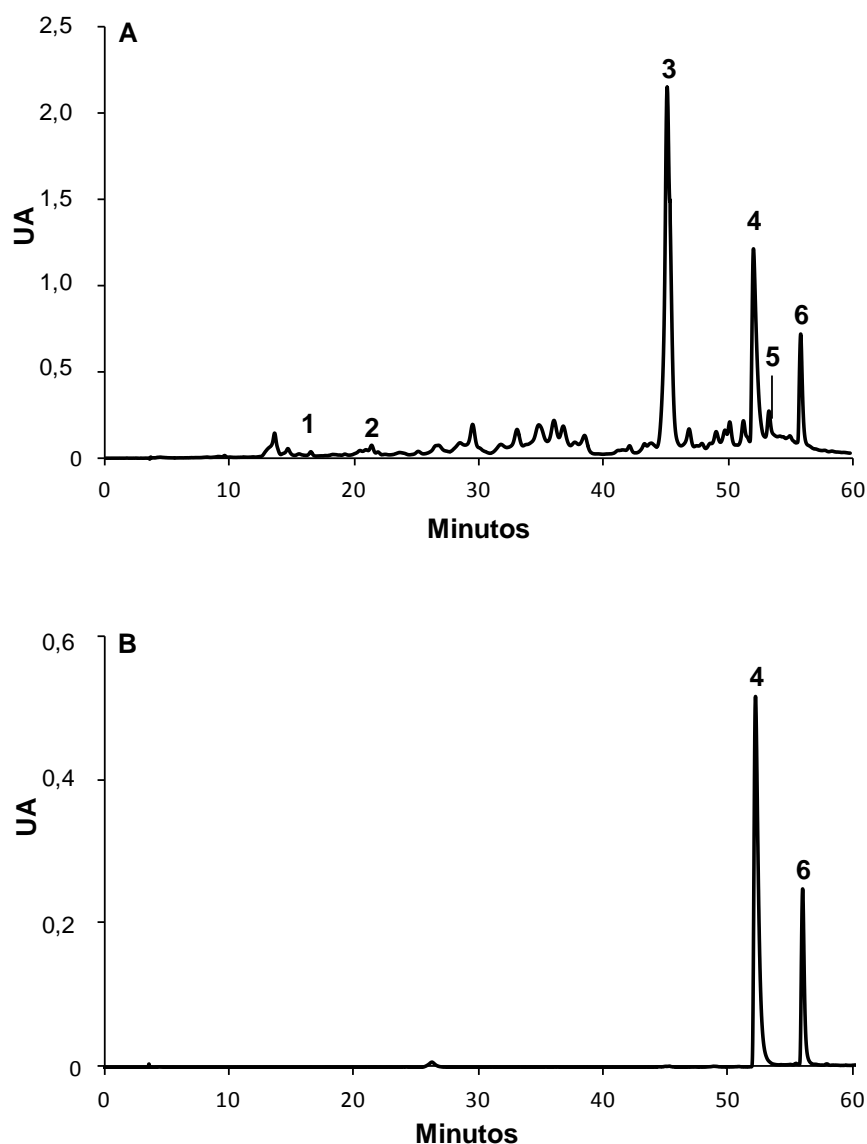


Figura 34. Perfil cromatográfico dos extratos metanólico (A) e de acetato de etilo (B) de folhas de *F. carica*, obtido por HPLC-DAD. Detecção a 320 nm. (1) Ácido 5-O-cafeoilquínico; (2) ácido ferúlico; (3) quercetina-3-O-rutinósido; (4) psoraleno; (5) quercetina; (6) bergapteno.

O conteúdo de cada composto nos dois tipos de extratos é distinto, sendo o metanólico o mais rico (Tabela 15). Tal como se verificou para os extratos aquosos liofilizados [5.1, (73)], as folhas e as polpas são os tecidos vegetais com maior e menor abundância destes compostos, respectivamente (Tabela 15).

Tal como observado nos extratos aquosos liofilizados [5.1, (73)], os extratos metanólicos dos diversos materiais são também caracterizados por grandes quantidades de quercetina-3-O-rutinósido (67,4 - 75,3% do teor total de compostos fenólicos). Comparando os extratos metanólicos das folhas frescas e liofilizadas da mesma cultivar, é possível verificar que os primeiros se caracterizam por terem quantidades inferiores de ácido 5-O-cafeoilquínico, ácido ferúlico, quercetina-3-O-rutinósido e psoraleno [5.6, (123)] (Tabela 15), e que os segundos se caracterizam pela presença de quercetina, a qual pode ser resultado da hidrólise do heterósido de quercetina (Tabela 15).

Conforme referido anteriormente, os extratos de acetato de etilo apresentam um perfil distinto, constituído unicamente por psoraleno (86,4 a 93,6%) e bergapteno (Figura 34 e Tabela 15). A presença de quantidades vestigiais destes compostos nas polpas impediu a sua quantificação (Tabela 15).

Tabela 15. Compostos fenólicos presentes nos extratos metanólico e de acetato de etilo de folhas e frutos (casca e polpa) da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* (mg/Kg, peso seco).

Compostos ^a	Extrato metanólico			Extrato de acetato de etilo		
	Folhas	Cascas	Polpas	Folhas	Cascas	Polpas
5-CQA	40,06 ± 0,07	3,59 ± 0,56	0,72 ± 0,13	-	-	-
Ácido ferúlico	84,05 ± 3,03	0,31 ± 0,05	-	-	-	-
Q-3-Rut	10697,45 ± 238,31	189,30 ± 0,07	2,38 ± 0,44	-	-	-
Psoraleno	2682,12 ± 222,26	0,52 ± 0,13	0,34 ± 0,02	1038,30 ± 16,16	0,19 ± 0,02	nq
Quercetina	503,30 ± 81,61	12,08 ± 1,43	-	-	-	-
Bergapteno	204,46 ± 7,65	0,16 ± 0,04	0,09 ± 0,01	71,30 ± 0,90	0,03 ± 0,01	nq
Total	14211,44	205,96	3,53	1109,60	0,22	nq

^a 5-CQA, Ácido 5-*O*-cafeoilquínico; Q-3-Rut, quercetina-3-*O*-rutinósido; nq, não quantificado.

6.1.4.2. Látex

Com o intuito de determinar a composição fenólica do látex de *F. carica* procedeu-se à análise por HPLC-DAD-MS.

Um dos traços caraterísticos da MS reside na utilização de princípios físicos diferentes, quer para a ionização da amostra, quer para a separação dos iões gerados (87). As primeiras técnicas de ionização usadas em MS, impacto eletrónico e ionização química, requeriam que o analito estivesse na fase gasosa para ser ionizado, o que obrigava à derivatização dos grupos hidroxilo. Recentemente surgiram métodos de ionização à pressão atmosférica, os quais são particularmente adequados para os sistemas combinados de cromatografia líquida e MS. Entre estas técnicas, a ionização por eletrospray (ESI) é a mais adequada para a análise de compostos termicamente instáveis, com maior polaridade e peso molecular. Esta técnica pode ser usada em dois modos: ião negativo ou ião positivo. O primeiro é bastante utilizado porque é menos afetado por sinais de impurezas interferentes ou ruído de fundo e porque os iões fenolato formados são bastante estáveis, tendo assim boa sensibilidade. No segundo o ruído é relativamente alto, o que impede a deteção de alguns compostos (86, 104). A procura de um determinado grupo de compostos em matrizes conhecidas pressupõe a ionização no modo positivo ou negativo; contudo, quando se trata de matrizes desconhecidas, como é o caso do látex de *F. carica*, a ionização deve ser efetuada em ambos os modos.

Assim, na Figura 35 (A-D) está representado o perfil cromatográfico do látex a 330 e 280 nm, bem como o cromatograma obtido utilizando a corrente total de iões (TIC) no modo negativo e positivo. Contudo, para comparar os diferentes cromatogramas é preciso ter em conta que, neste equipamento de MS, os picos no cromatograma TIC aparecem adiantados 0,3 a 0,4 minutos relativamente aos cromatogramas de UV.

Os espectros de UV pareciam sugerir a existência de derivados de ácidos hidroxicinâmicos. No entanto, apesar de se observarem caraterísticas de absorção e de ionização típicas destes compostos, não se visualizou nenhum fragmento caraterístico de ácidos hidroxicinâmicos ou de flavonoides, pelo que não foi possível identificar qualquer composto fenólico na análise por HPLC-DAD-MS.

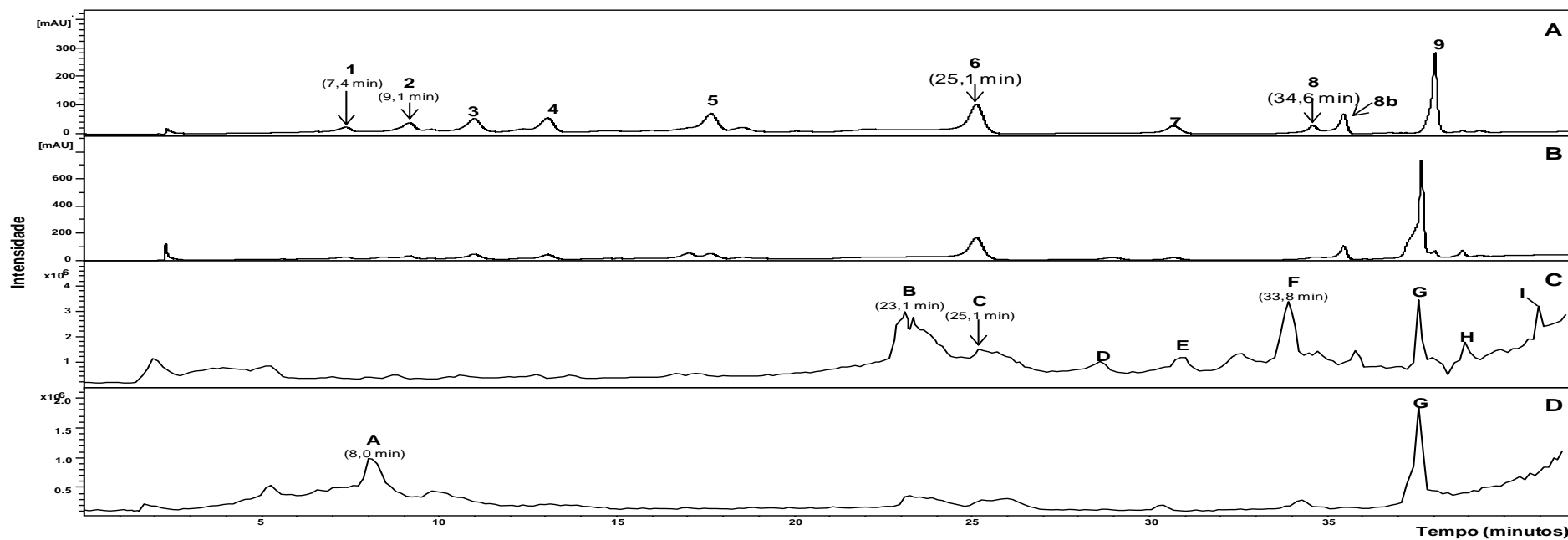


Figura 35. Perfil cromatográfico do látex obtido por HPLC-DAD-MS. (A) Cromatograma UV a 330 nm; (B) Cromatograma registrado a 280 nm; (C) TIC no modo negativo; (D) TIC no modo positivo.

6.1.5. Fitosteróis

Os fitosteróis são importantes como marcadores de autenticidade. No decorrer da caracterização metabólica do látex, e estando já descrita a ocorrência de derivados de β -sitosterol neste material (137), procedeu-se à determinação por HPLC-DAD, e após hidrólise alcalina, do seu perfil de fitosteróis. Foram identificados 7 compostos livres: β -sitosterol, α -amirina, betulol, lupeol, lanosterol, acetato de lupeol e β -amirina. Com exceção do β -sitosterol, todos os outros compostos foram descritos pela primeira vez nesta matriz [5.5, (111)].

Os resultados obtidos demonstram que o látex é rico em fitosteróis, contendo cerca de 20 g/Kg. O β -sitosterol é o composto mais abundante, correspondendo a 53,9% do conteúdo total de fitosteróis livres (Figura 36). A α -amirina é o composto minoritário (0,4%) (Figura 36).

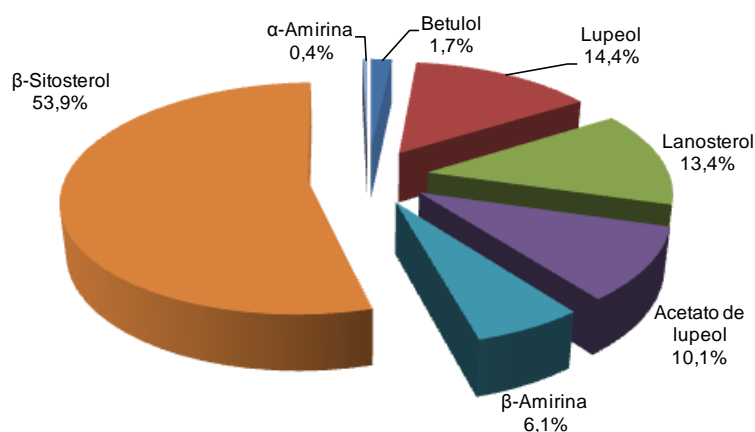


Figura 36. Fitosteróis no látex de *F. carica*, cultivar “Pingo de Mel”.

Tendo em conta a quantidade elevada de fitosteróis presentes no látex, pareceu-nos também relevante determinar a presença destes compostos em outros materiais potencialmente ativos, como as folhas. Assim, e para avaliar a possível utilização destes compostos como marcadores taxonómicos, foi determinado o perfil de fitosteróis das folhas das cinco cultivares Portuguesas de *F. carica* (“Pingo de Mel”, “Branca Tradicional”, “Borrasota Tradicional”, “Verbera Preta” e “Preta Tradicional”), tendo sido identificados 5 compostos: β -sitosterol, betulol, lanosterol, acetato de lupeol e β -amirina [5.6, (123)]. Comparando os conteúdos de fitosteróis presentes nas folhas com os existentes no látex [5.5, (111)] pode-se concluir que a quantidade destes metabolitos no último é cerca de 4 a 10 vezes superior à existente nas folhas.

Apesar dos extratos de folhas das diferentes cultivares apresentarem o mesmo perfil qualitativo, observaram-se diferenças a nível quantitativo (Figura 37). O conteúdo total de fitosteróis variou entre 2052,7 mg/Kg e 5262,6 mg/Kg, sendo as cultivares “Pingo de Mel” e “Preta Tradicional” as que apresentam quantidades menores destes compostos.

Contrariamente ao látex, o qual é predominantemente constituído por β -sitosterol conforme referido atrás (Figura 36), nas folhas observam-se grandes quantidades de lanosterol (47,3 a 59,4% do conteúdo total de fitosteróis) (Figura 37). A β -amirina foi o composto minoritário (7,0 a 7,7% do conteúdo total) nas cultivares “Pingo de Mel” e “Preta Tradicional”, enquanto nas restantes cultivares foi o β -sitosterol o composto presente em menor quantidade (8,0 a 10,5% do conteúdo total) (Figura 37).

O perfil de fitosteróis das diferentes cultivares revelou ser mais constante do que o perfil de compostos fenólicos [Ver secção 6.1.4.1.2]. De facto, o betulol foi o único fitosterol para o qual se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cultivares. Foi também avaliada a variabilidade entre indivíduos da mesma cultivar, tendo-se verificado diferenças no teor de cada composto (Figura 37), o que pode estar relacionado com a própria posição das folhas na planta, uma vez que quanto maior é a exposição às radiações UV, maior é a produção destes metabolitos para promoverem a adaptação da membrana às elevadas temperaturas a que as células estão sujeitas (266).

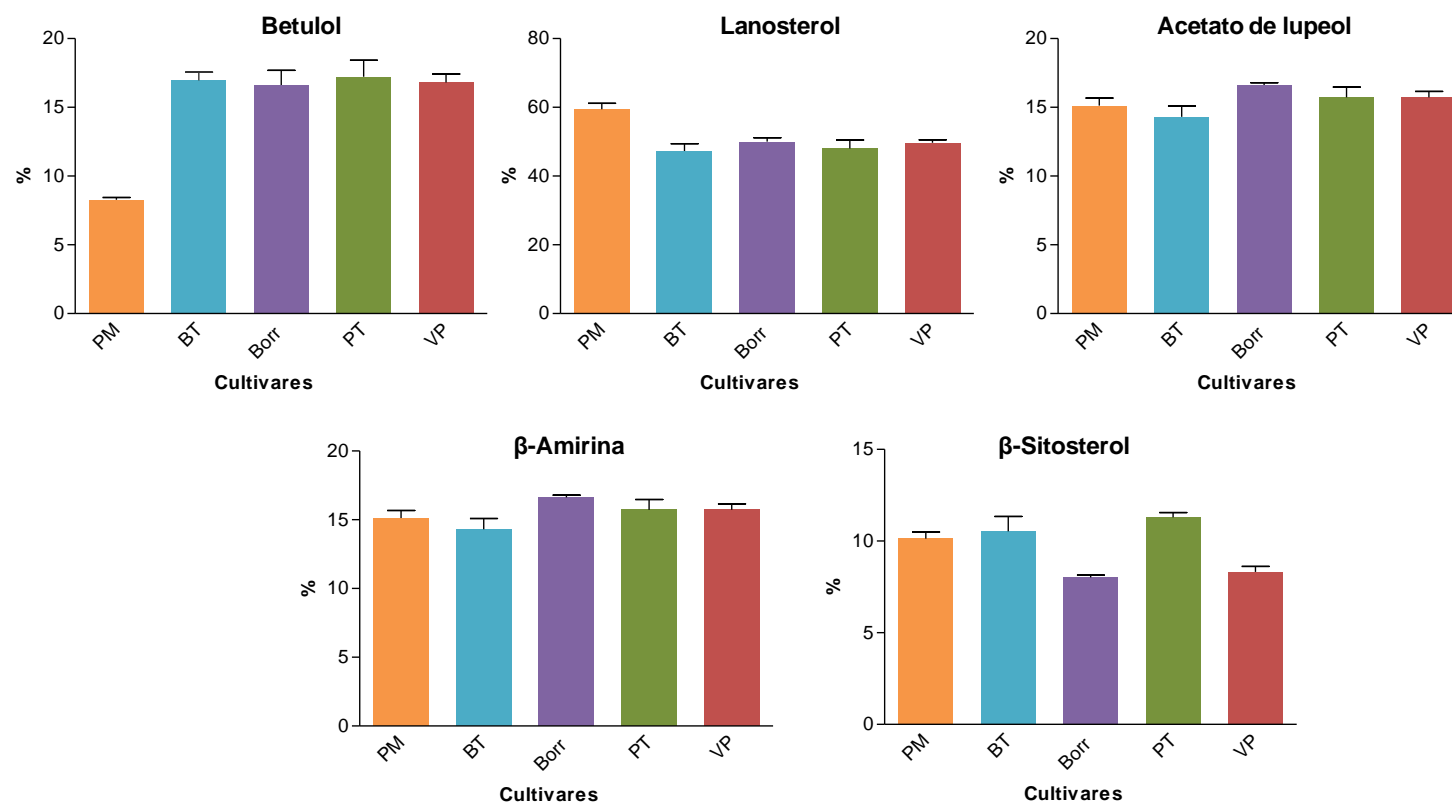


Figura 37. Fitosteróis nos extratos hidrolisados das folhas de diferentes cultivares de *F. carica*: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 indivíduos analisados em triplicado.

6.1.6. Compostos voláteis

Os compostos voláteis afetam diretamente a qualidade sensorial dos frutos frescos e processados, podendo a sua concentração ser influenciada por fatores agronômicos (condições climáticas e estado de maturação) e tecnológicos (modo de colheita, armazenamento e processamento) (233).

6.1.6.1. Compostos voláteis de baixo peso molecular

Durante o processo de amadurecimento dos frutos são produzidos compostos de baixo peso molecular, como o metanol, os quais podem ser tóxicos para o ser humano. De modo a determinar estes compostos, e uma vez que o processamento das amostras pode afetar o seu teor, as folhas e frutos (casca e polpa) das cultivares brancas de *F. carica* (“Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”) foram sujeitas a dois tipos de conservação (congelamento e liofilização). Os compostos foram extraídos por HS-SPME e analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) [5.2, (81)].

Todas as amostras apresentaram um perfil semelhante, constituído por 8 compostos: acetaldeído, acetato de etilo, metanol, etanol, hexanal, limoneno, (*E*)-2-hexenal e octanal (Figura 38). Os teores destes compostos nas amostras analisadas variaram entre 622,43 mg/Kg (amostra congelada das polpas “Branca Tradicional”) e 3196,38 mg/Kg (amostra liofilizada das folhas “Pingo de Mel”).

O metanol (50,8 a 88% dos compostos identificados), o etanol (9,1 a 39,4%) e, em menor extensão, o acetaldeído (1,7 a 12,9%), foram os compostos mais abundantes (Figura 38). O metanol pode ser originário de uma desesterificação dos ésteres metílicos de pectina e tanto o etanol como o acetaldeído são precursores de compostos do aroma (267-269). Por outro lado, o acetaldeído é obtido do piruvato por ação da piruvato descarboxilase, sendo posteriormente convertido em etanol e acetil-CoA, pelas enzimas álcool desidrogenase e aldeído desidrogenase, respetivamente (268, 269). Tal como se verifica para outros frutos, o aumento de acetaldeído e etanol pode estar relacionado com uma diminuição de piruvato e com um aumento da atividade das respetivas enzimas (270).

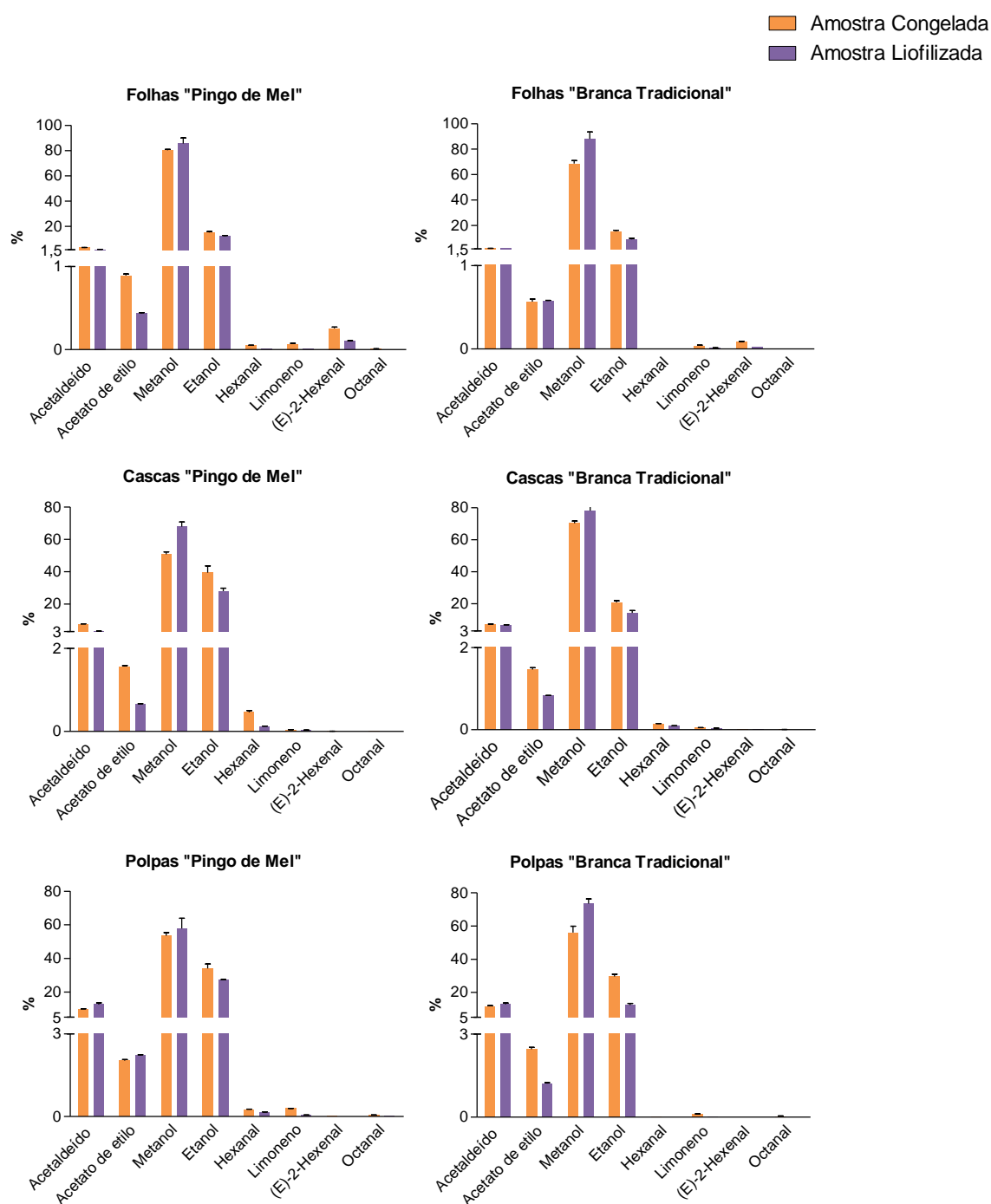


Figura 38. Compostos voláteis de baixo peso molecular em folhas e frutos (casca e polpa) de duas cultivares de *F. carica* sujeitas a dois tipos de conservação. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 determinações.

Relativamente aos dois processos de conservação, sabe-se que, apesar da liofilização ser a técnica mais apropriada para preservar amostras que tenham que ser armazenadas antes de serem analisadas (271), pode causar diminuição do conteúdo de compostos voláteis. Assim, o congelamento será melhor para preservar o sabor e o aroma dos frutos e vegetais. De facto, durante o processo de liofilização observou-se uma diminuição dos

teores da maioria dos compostos identificados. No entanto, em algumas amostras verificou-se um aumento de metanol e acetaldeído, o qual pode estar relacionado com as próprias características da matriz, uma vez que estes dois compostos estão frequentemente associados a pectinas e aminas (269, 272) e, durante o processo de liofilização pode ter ocorrido a quebra destas ligações contribuindo assim para a sua libertação, e consequentemente, para um aumento do seu conteúdo.

6.1.6.2. Caracterização da fração volátil por GC-MS

A análise da fração volátil e semi-volátil das folhas e frutos das cinco cultivares de *F. carica*, bem como do látex da cultivar “Pingo de Mel”, por HS-SPME/GC-MS, permitiu determinar 68 metabolitos [(5.3, 5.4), (91, 103)]. Foram encontrados compostos de diversas classes, provenientes de vias metabólicas distintas, que podem ser agrupados em aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres, monoterpenos, sesquiterpenos e norisoprenóides, e outros de classes distintas (Tabela 16). Além dos compostos indicados na Tabela 12, neste trabalho foram descritos pela primeira vez 39 compostos em *F. carica*.

As cinco cultivares revelaram um perfil semelhante, tendo sido encontrados 40 compostos nas folhas, 32 nas polpas do fruto e 28 nas cascas do fruto. No látex foram identificados 34 compostos, sendo de realçar a sua riqueza em terpenos (94% do total de compostos identificados) (Figura 39), os quais podem estar relacionados com o papel de defesa deste material (273). De modo geral, para todas as classes de metabolitos foram encontrados compostos específicos de determinado material, que poderão ter interesse para a sua distinção.

Assim, apenas 7 e 9 dos 19 sesquiterpenos identificados foram encontrados nos frutos e látex, respetivamente, sendo o α -ilangeno, β -burboneno, β -elemeno, α -gurjuneno, β -cubebeno, aloaromadendreno, (+)-ledeno, τ -elemeno, e o α -muroleno exemplos de compostos que só estão presentes nas folhas e que podem ser considerados marcadores deste material. Por outro lado, é possível salientar a presença de (*E*)- α -bergamoteno e α -calacoreno nas polpas de duas cultivares tintas (“Borrasota Tradicional” e “Verbera Preta”) e no látex e de α -guaieno, α -cariofileno, τ -muroleno, germacreno D e τ -cadineno nas folhas e no látex.

Entre os 15 aldeídos encontrados, o heptanal, (*Z*)-2-heptenal, benzaldeído, octanal, (*E*)-2-octenal e o (*E,Z*)-2,6-nonadienal só existem nas polpas e nas cascas do fruto, o (*E*)-2-metil-2-butenal e o nonanal aparecem somente nas polpas e o (*E,E*)-2,4-heptadienal é específico das cascas. Relativamente aos monoterpenos, é possível salientar a presença

de limoneno e mentol nas folhas, de linalol e do seu epóxido nas polpas, de terpinoleno, α -tuiona e óxido de *cis*-linalol no látex e de β -pineno nas cascas.

No que diz respeito aos álcoois, o 2-metil-1-butanol e o 1-heptanol aparecem unicamente nas folhas e no látex, o (*Z*)-3-hexenol nas cascas dos frutos das cultivares “Pingo de Mel” e “Borrasota Tradicional”, enquanto o 1-pentanol, 1-hexanol e o álcool fenilpropílico são específicos do látex. Das duas cetonas determinadas, a 3-pentanona foi detetada unicamente nas folhas.

No que concerne aos ésteres, é possível realçar a presença de salicilato de etilo nas polpas e de acetato de hexilo e benzoato de etilo nas folhas. O salicilato de metilo é o único composto desta classe que foi detetado no látex. Além dos compostos mencionados anteriormente, as cascas dos frutos e o látex caracterizam-se pela ausência de norisoprenóides, nomeadamente de β -ciclocitral.

Tabela 16. Compostos voláteis nas folhas, frutos e látex de cultivares de *F. carica*^a.

Classe	“PM”				“BT”			“Borr”			“VP”			“PT”		
	F	C	P	L	F	C	P	F	C	P	F	C	P	F	C	P
Aldeídos	5	8	12	5	3	9	13	5	7	12	5	9	13	5	8	12
Álcoois	6	6	1	7	6	4	1	6	4	-	6	4	-	6	5	1
Cetonas	1	-	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	-	-
Ésteres	3	2	3	1	5	2	3	3	2	3	4	2	3	3	2	3
Monoterpenos	2	5	6	9	2	5	6	2	5	6	2	4	6	2	5	6
Sesquiterpenos	17	5	5	9	16	5	2	17	5	6	16	5	4	17	5	5
Norisoprenóides	1	-	1	-	1	-	1	1	-	1	1	-	1	1	-	1
Diversos	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1

^a “PM”, “Pingo de Mel”; “BT”, “Branca Tradicional”; “Borr”, “Borrasota Tradicional”; “VP”, “Verbera Preta”; “PT”, “Preta Tradicional”; F, folhas; C, cascas; P, polpas; L, látex.

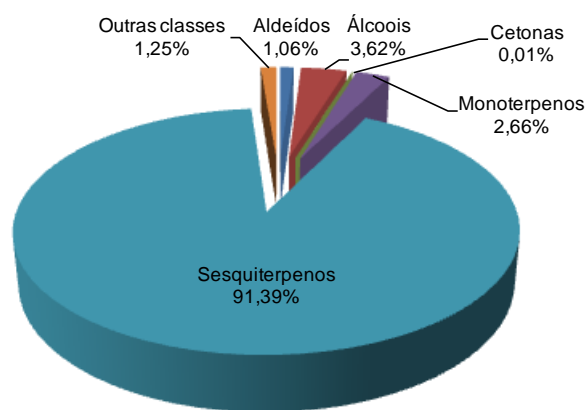


Figura 39. Classes químicas dos compostos voláteis do látex de *F. carica*, cultivar “Pingo de Mel”.

Da análise individual dos diferentes tecidos vegetais foi possível verificar que as folhas possuem quantidades superiores de álcoois, cetonas, ésteres, norisoprenóides, sesquiterpenos e de outras classes, nomeadamente de psoraleno e γ -nonalactona, sendo os sesquiterpenos os compostos presentes em maior diversidade e abundância (Tabela 16 e Figura 40). Nos frutos destacam-se os aldeídos e monoterpenos (Tabela 16 e Figura 40). A emissão de terpenos pode ser um sinal interno da própria planta para indicar a presença de herbívoros e de outros agentes patogénicos, permitindo assim a indução de defesas diretas e indiretas nos tecidos vizinhos (273-275). Para além disso, os terpenos e os aldeídos desempenham um papel importante na atração dos polinizadores (276).

Os compostos voláteis podem ser formados a partir de aminoácidos e de ácidos gordos e, para além das vias metabólicas mencionadas anteriormente [Secção 2.2.2.3.], muitos metabolitos podem ser originados a partir de dois processos básicos: α -oxidação (os ácidos gordos livres com 12 a 18 átomos de carbono são enzimaticamente degradados a aldeídos de cadeia longa), e β -oxidação (remoção sucessiva de unidades acetil CoA dos ácidos gordos) (145), sugerindo uma correlação biossintética entre as diferentes classes de metabolitos. De facto, compostos voláteis como o benzaldeído, álcool feniletílico, salicilato de metilo e eugenol são formados a partir da fenilalanina, enquanto os derivados metilados do butanol (3-metil- e 2-metil-1-butanol) derivam da isoleucina. Os aminoácidos sofrem desaminação e transaminação levando à formação do respetivo α -cetoácido, o qual é posteriormente descarboxilado, reduzido, oxidado e/ou esterificado dando origem a aldeídos, ácidos, álcoois e ésteres (139). A Figura 41 representa de forma esquemática a relação biossintética entre aminoácidos, ácidos gordos e compostos voláteis.

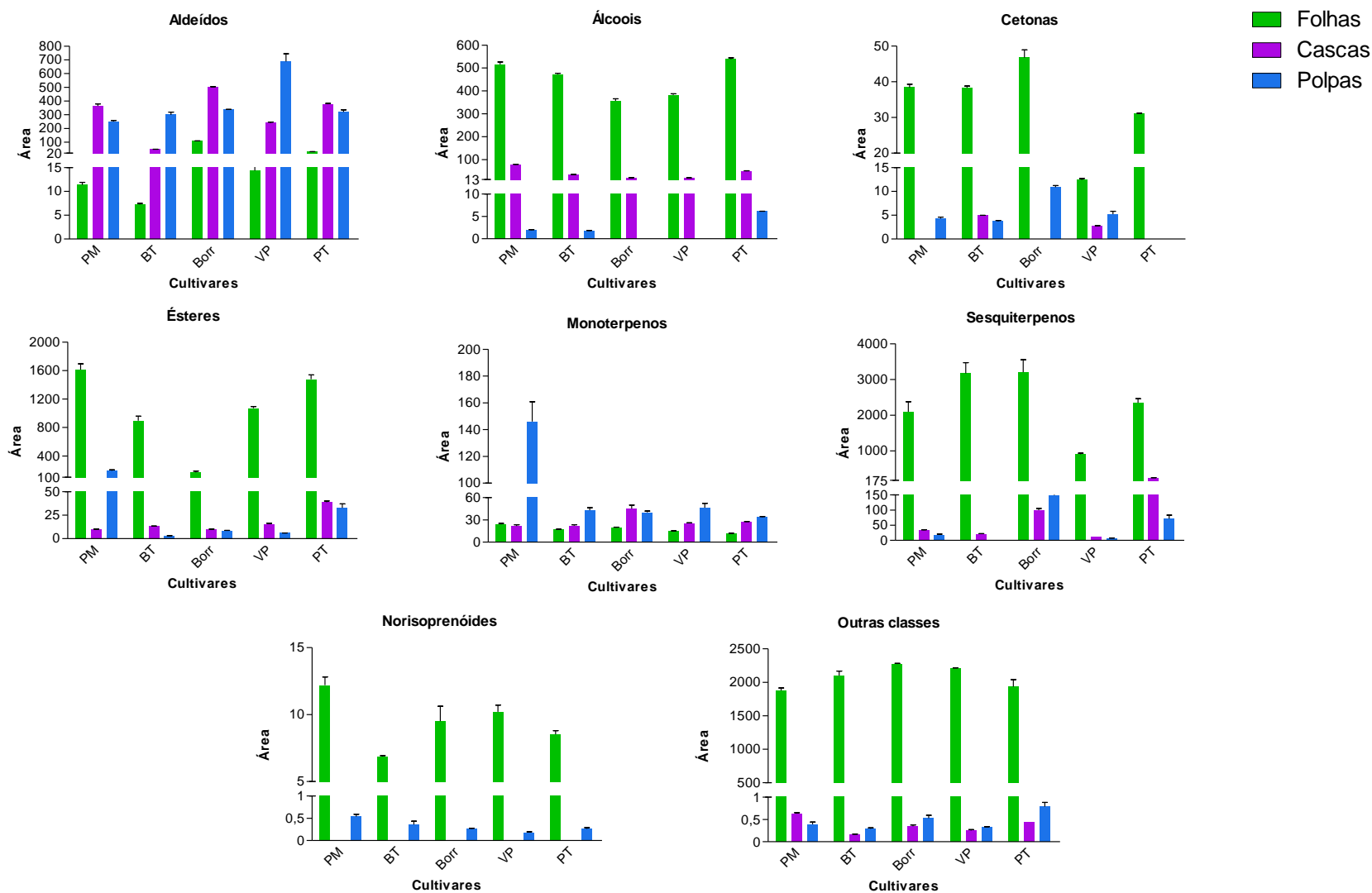


Figura 40. Compostos voláteis nas folhas e frutos (casca e polpa) de 5 cultivares de *F. carica*: PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 3 determinações.

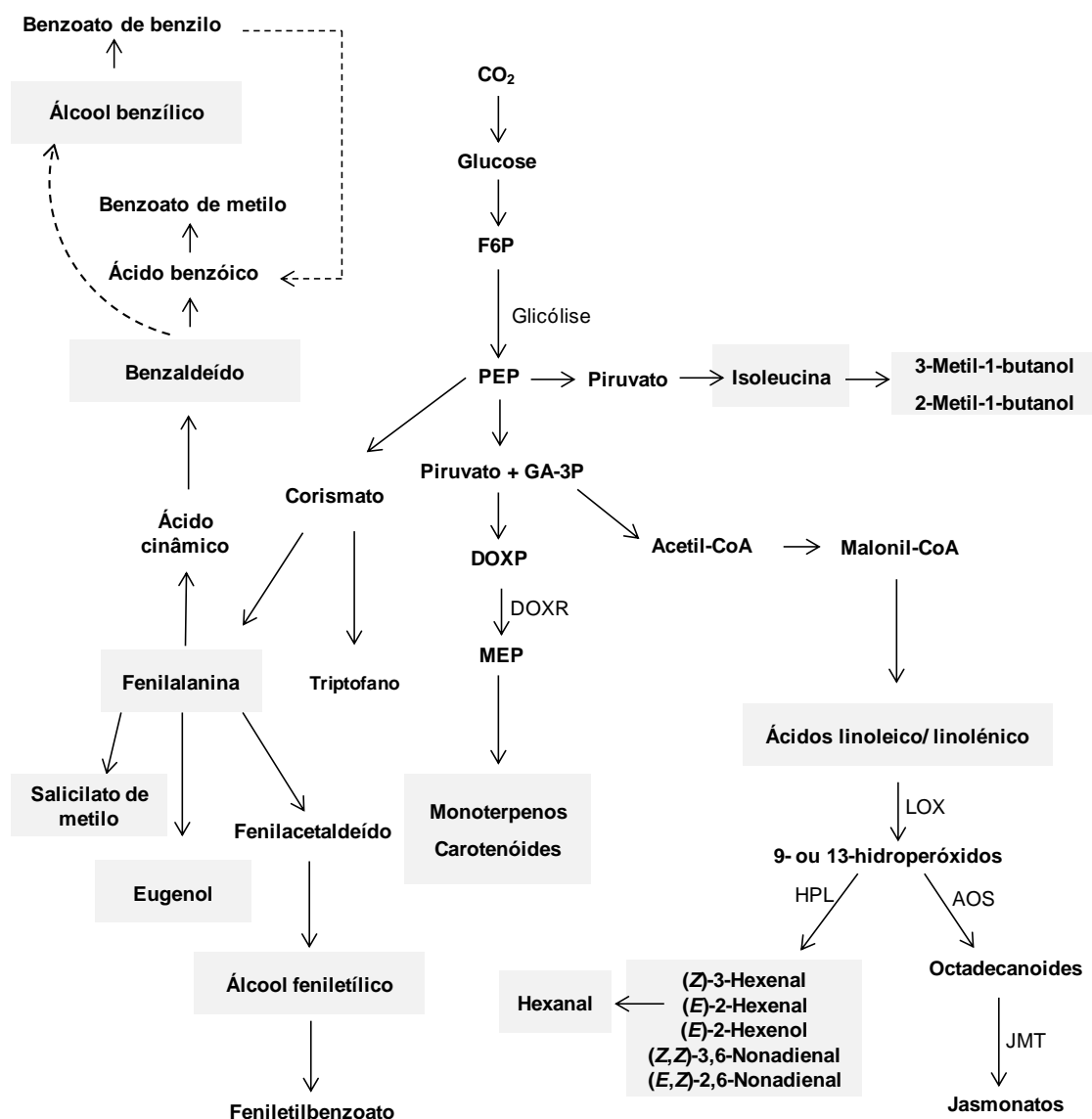


Figura 41. Esquema simplificado da relação biossintética existente entre diferentes classes de compostos. F6P, frutose-6-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; DOXP, 1-desoxi-D-xilulose fosfato; DOXR, redutoisomerase de 1-desoxi-D-xilulose fosfato; GA-3P, gliceraldeído-3-fosfato; LOX, lipoxigenase; MEP, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato; HPL, hidroperóxido liase; AOS, aleno óxido sintase; JMT, metiltransferase do ácido jasmônico [adaptado de (139)].

6.2. Caracterização morfológica e molecular

A análise morfológica possibilita, em muitos casos, discriminar cultivares dentro de uma dada espécie. Com o intuito de avaliar as diferenças morfológicas entre indivíduos da mesma cultivar e entre diferentes cultivares procedeu-se à avaliação de cinco caracteres morfológicos das folhas de *F. carica*: diâmetro e comprimento do pedúnculo, número de lobos, diâmetro e comprimento da folha (Figura 42). Foi igualmente determinada a área foliar (diâmetro x comprimento do limbo) [5.6, (123)].

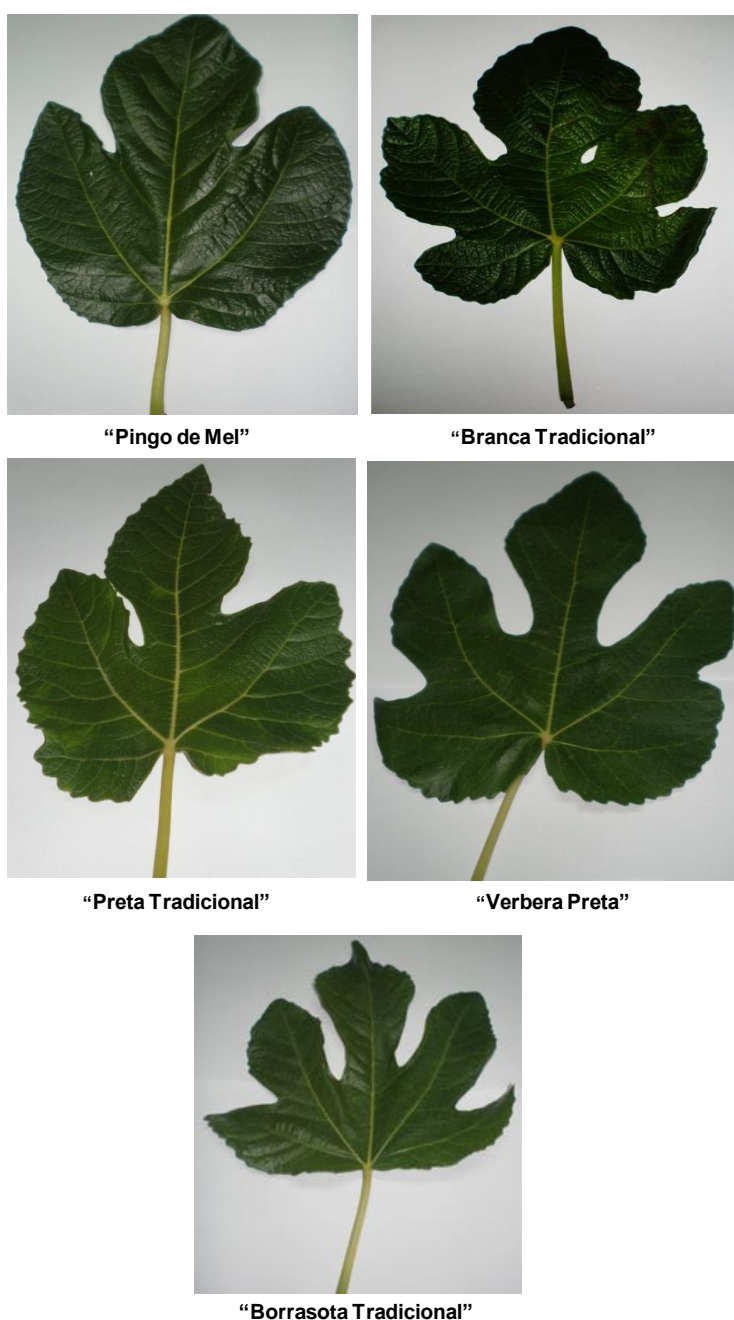


Figura 42. Folhas das cinco cultivares de *F. carica* (Fotografias de Andreia P. Oliveira).

Entre os indivíduos da mesma cultivar o comprimento do pedúnculo e o número de lobos foram os únicos caracteres morfológicos que não variaram. O comprimento e o diâmetro do pedúnculo das diversas cultivares é semelhante.

A análise de *clusters* baseada nas características morfológicas das cinco cultivares agrupou os diferentes indivíduos em dois grupos distintos, sendo o *cluster* I subdividido em dois (Figura 43). Através da análise do dendograma é possível verificar que o *cluster* Ia é composto pelos três indivíduos das cultivares “Preta Tradicional” e “Borrasota Tradicional” e por um da cultivar “Branca Tradicional” e o *cluster* Ib é constituído pelos fenótipos das cultivares “Pingo de Mel” e “Verbera Preta”. O *cluster* II é formado por dois indivíduos da cultivar “Branca Tradicional”. Assim, é possível concluir que a variabilidade morfológica não permitiu o agrupamento nítido dos diferentes indivíduos da mesma cultivar.

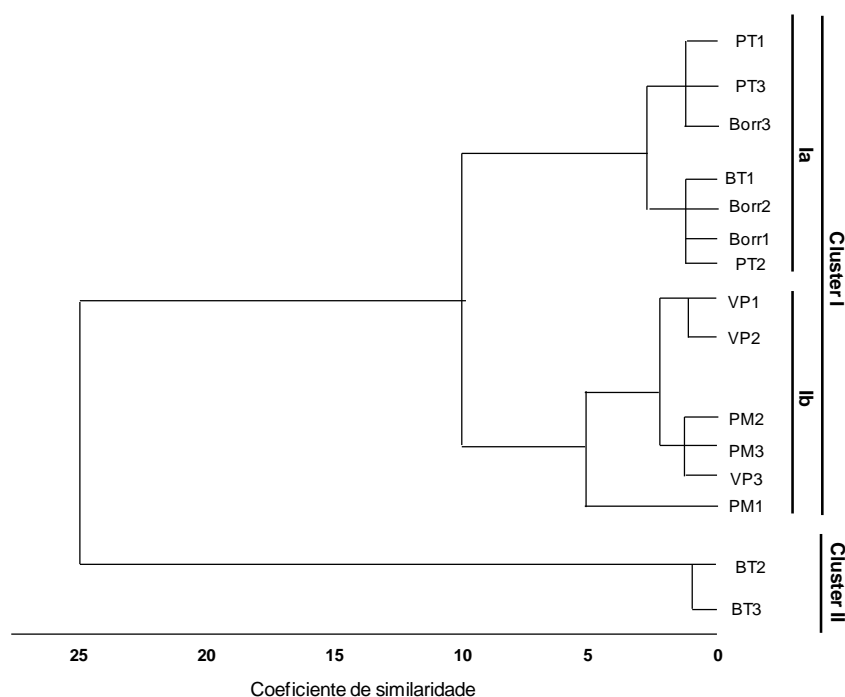


Figura 43. Dendrograma obtido da análise de *clusters* relativa às características morfológicas de 3 indivíduos de folhas de 5 cultivares de *F. carica*. PM, “Pingo de Mel”; BT, “Branca Tradicional”; Borr, “Borrasota Tradicional”; VP, “Verbera Preta”; PT, “Preta Tradicional”. Os números associados a cada cultivar correspondem a diferentes indivíduos.

No seguimento da caracterização da diversidade genética das cultivares em estudo, procedeu-se à análise de marcadores moleculares. Recorreu-se a duas regiões do cpDNA, uma região codificante (*rbcl*) e uma região não codificante (espaço intergénico *trnH-psbA*), as quais são amplamente utilizadas em estudos de sistemática de plantas [5.6, (123)]. A *rbcl* é uma região do cpDNA que codifica a subunidade da enzima ribulose-1,5-difosfato carboxilase, mais conhecida como Rubisco. Esta região caracteriza-

se por baixos níveis de substituição de nucleótidos e fornece informação suficiente para reconstruir as relações de filogenia a nível intra-genérico (277-280).

A região intergénica *trnH-psbA* é muito utilizada para elucidar relações filogenéticas a nível intra-específico; contudo, a presença de uma estrutura com diversos nucleótidos de adenina e timina reduz a taxa de sucesso de sequenciação do DNA. Adicionalmente, a presença frequente de inserções e deleções de nucleótidos nesta região torna-a uma das mais variáveis do genoma plastidial em plantas angiospérmicas e dificulta o alinhamento das sequências. Assim, para promover a identificação e diferenciação de espécies recomenda-se o uso combinado das duas regiões do cpDNA (279, 280).

Ambas as regiões de cpDNA foram amplificadas com sucesso em todos os indivíduos [5.6, (123)]. Os resultados obtidos permitem observar que todas as sequências de cpDNA obtidas com a região *rbcL* revelaram 98 a 100% de similaridade com *F. carica*.

Contrariamente, com a região não codificante só 10 das 15 sequências analisadas apresentaram mais de 96% de similaridade com a espécie *F. carica*. As sequências restantes exibiram maior proximidade com outras espécies do género *Ficus*, nomeadamente com *Ficus bullenei* L. e *Ficus obtusifolia* L.

Com a região *trnH-psbA* observaram-se algumas sequências repetidas com 23-24 pb de comprimento e uma região invertida de 30-32 pb flanqueada em ambos os lados por uma sequência palindrômica de 19-20 pb. Estas inversões e repetições combinadas com as frequentes inserções e deleções de nucleótidos podem explicar a elevada variabilidade desta região, dificultando assim o seu alinhamento e consequente análise (279).

A relação entre a diversidade genética e a composição química é bastante controversa. Na realidade, existem estudos que demonstram a influência do genoma no metaboloma e outros que descrevem a ausência de qualquer relação entre ambos. Assim, e com o intuito de avaliar os possíveis efeitos da diversidade genética no metaboloma, foram determinados metabolitos secundários, compostos fenólicos e fitosteróis (Ver secções 6.1.4.1.2 e 6.1.5, respetivamente), nas folhas das cinco cultivares Portuguesas de *F. carica*. No entanto, apesar de se terem observado diferenças nos teores de alguns metabolitos entre as diversas cultivares (Figuras 33 e 37) e entre os indivíduos da mesma cultivar, com exceção da cultivar “Preta Tradicional”, não foi possível estabelecer uma correlação entre o genoma e o metaboloma [5.6, (123)].

6.3. Atividade biológica de *F. carica*

Tal como referido anteriormente, as plantas são capazes de sintetizar e acumular vários compostos de natureza química e propriedades diversificadas, muitos dos quais são explorados pelo Homem desde longa data (281). Tais compostos, para além de desempenharem funções importantes no metabolismo e na defesa das plantas, possuem um vasto leque de atividades biológicas. A caracterização do perfil metabólico de *F. carica* permitiu confirmar que esta espécie possui diversos metabolitos com interesse. Assim, procedeu-se à realização de ensaios *in vitro* para avaliar o potencial antioxidante, a capacidade para inibir a AChE, bem como a atividade antimicrobiana dos diversos materiais. Como estes demonstraram propriedades antioxidantes em sistemas não celulares, avaliou-se também o seu potencial protetor em sistemas celulares, usando fibroblastos de pulmão de hamster (células V79) e células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) expostos ao H₂O₂ e rotenona, respetivamente.

Nas secções seguintes serão discutidos os resultados obtidos na avaliação das diversas atividades biológicas e a sua relação com o perfil metabólico.

6.3.1. Ação antioxidante

O interesse na descoberta de novos compostos antioxidantes naturais tem aumentado ao longo dos anos. Além dos efeitos benéficos para a saúde, os antioxidantes são utilizados para evitar a deterioração de alimentos, sendo que em ambos os casos os de origem sintética são preteridos em relação aos de origem natural (282).

6.3.1.1. Sistemas químicos

6.3.1.1.1. DPPH[•]

A atividade antioxidante das folhas, frutos (cascas e polpas) e látex de *F. carica* foi avaliada relativamente ao radical DPPH. Este é um radical livre estável, que se torna numa espécie não radicalar dificilmente oxidável quando aceita um eletrão ou um átomo de hidrogénio. Apesar de não ser um radical formado no organismo, o consumo de DPPH[•] é utilizado para estimar a capacidade antioxidante de compostos ou extratos na captura de radicais livres presentes no meio (283).

A proporcionalidade entre a concentração de amostra e a respetiva atividade de todos os materiais deixou de se verificar antes de se atingir 50% da neutralização do radical,

impossibilitando assim o cálculo do valor de IC₅₀. Para ser possível a comparação entre as atividades das diferentes amostras foi calculado o valor de IC₂₅, valor para o qual é verificada essa proporcionalidade. Como se pode concluir pela análise da Tabela 17, os extratos apresentam potencial antioxidante, sendo a folha o material mais ativo.

Tabela 17. Atividade antioxidante de duas cultivares brancas de *F. carica*^a.

	“Pingo de Mel”				“Branca Tradicional”		
	F	C	P	L	F	C	P
DPPH [•]	75,2	2948,7	>5556,0 ^b	1049,0	59,6	1724,3	4056,4
O ₂ ^{•-}	33,0	—	—	291,0	15,6	—	—
[•] NO	63,2	2425,5	3154,8	1768,0	118,5	2195,7	7623,2

^aValores correspondem a IC₂₅ (µg/mL). F, Folhas; C, cascas, P, polpas; L, látex; ^bPara a concentração máxima testada obteve-se 18% de intercepção do DPPH[•].

A cultivar “Branca Tradicional” demonstrou maior capacidade para intercetar este radical, o que pode estar parcialmente relacionado com o facto de possuir maior quantidade de compostos fenólicos, nomeadamente de flavonoides [5.1, (73)] (Tabela 17). Além disso, parece existir alguma correlação entre a composição fenólica e a atividade antioxidante observada para este radical, uma vez que as matrizes com maior teor destes compostos (folhas) [(5.1, 5.4), (73, 103)] (Tabela 17), revelaram maior potencial antioxidante. Por outro lado, é preciso ter em conta a existência de outros compostos que não foram determinados e que podem contribuir para esta atividade.

6.3.1.1.2. Radical anião superóxido

O O₂^{•-} resulta da redução da molécula de oxigénio por um único eletrão e pode ser formado *in vivo* por três vias metabólicas principais: via cadeia respiratória da mitocôndria, via xantina oxidase e via nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH) oxidase em fagócitos ativados. Apesar do seu efeito nefasto, este radical não é muito reativo, desempenhando, também, uma função vital para as células. Está envolvido nas reações de oxidação mediadas pelo citocromo P450, na regulação do

tónus do músculo liso e na ação bactericida dos leucócitos (184). A sua toxicidade deve-se à sua participação em processos químicos importantes no contexto biológico, nomeadamente ao seu envolvimento na formação de outras espécies de oxigénio extremamente reativas, como $\cdot\text{OH}$, por reação com o H_2O_2 , e ONOO^- , por reação com o $\cdot\text{NO}$.

Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos dos diversos materiais de *F. carica* recorreu-se a um sistema não enzimático para gerar o radical: o metossulfato de fenazina (PMS) é reduzido pelo NADH e reage posteriormente com o oxigénio, produzindo $\text{O}_2^{\cdot-}$ (284).

As folhas e o látex foram os únicos materiais que revelaram capacidade para sequestrar $\text{O}_2^{\cdot-}$ de uma forma dependente da concentração, sendo as folhas da cultivar “Pingo de Mel” mais ativas do que o látex da mesma cultivar, uma vez que apresenta um IC_{25} cerca de 9 vezes inferior [(5.1, 5.4), (73, 103)] (Tabela 17). Apesar da cultivar “Branca Tradicional” apresentar um conteúdo fenólico total inferior ao da “Pingo de Mel”, a primeira revelou ser mais eficaz contra esta espécie reativa, o que pode estar relacionado com a presença de quantidades superiores de quercetina-3-O-rutinósido e de furanocumarinas (285), além de outros compostos que possam estar presentes nos extratos, mas que não foram determinados nesta dissertação.

6.3.1.1.3. Óxido nítrico

O $\cdot\text{NO}$ pode ser produzido no organismo pela ação de sintases do óxido nítrico (neurais e endoteliais) a partir da L-arginina, oxigénio e NADPH e por redução de nitratos orgânicos. Este radical desempenha um papel essencial no organismo, controlando a pressão sanguínea devido ao seu efeito vasodilatador, a neurotransmissão e participando na atividade citostática e citotóxica de macrófagos ativados. No entanto, a produção excessiva de $\cdot\text{NO}$ pode contribuir para a evolução de doenças neurodegenerativas, inflamação crónica, arteriosclerose, choque séptico, hipertensão arterial, falência renal, broncospasmo, enfarte do miocárdio e impotência masculina. Além disso, em meio aquoso, o $\cdot\text{NO}$ sofre dismutação, dando origem a H_2O_2 e oxigénio, sendo o seu ácido conjugado, o radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), mais reativo (188, 286, 287).

O radical $\cdot\text{NO}$ pode ser gerado *in vitro* a partir do nitroprussiato de sódio (SNP), em solução aquosa a pH fisiológico. Na presença de oxigénio este radical dá origem a nitrito, que pode ser determinado através da reação de Griess (288).

Todas as matrizes revelaram potencial para intercetar o $\cdot\text{NO}$, sendo as folhas o material com maior atividade [(5.1, 5.4), (73, 103)] (Tabela 17). De modo geral, a cultivar “Pingo de Mel” demonstrou maior capacidade para intercetar esta espécie reativa do que a “Branca Tradicional”. Tal facto pode estar parcialmente relacionado com as maiores quantidades de ácidos hidroxicinâmicos, nomeadamente de ácido ferúlico e de derivados do ácido cafeico, observadas nesta cultivar, os quais apresentam elevado potencial para sequestrar o radical $\cdot\text{NO}$ (289). Adicionalmente, não se pode negligenciar a presença de compostos como os flavonoides, os quais também são reconhecidos pela capacidade para intercetar este radical (290).

6.3.1.2. Sistemas celulares

As linhas celulares são constituídas por um único tipo de células que se propagam em série durante um número limitado de divisões celulares (geralmente cerca de trinta) ou, em alguns casos, de forma ilimitada. As linhas celulares, por serem mais homogêneas e mais estáveis, são portanto mais reprodutíveis do que as populações de células primárias, sendo muito importantes para a realização de estudos mecanísticos. Contudo nestes sistemas é importante ter em conta que o ascorbato, flavonoides, assim como outros compostos fenólicos, e tióis são habitualmente instáveis em concentrações elevadas (291). Por outro lado, sabe-se que as células que sobrevivem em cultura nem sempre são representativas das células *in vivo*, em termos de metabolismo, expressão de genes e níveis enzimáticos, sendo por isso necessário ter algum cuidado na extrapolação dos dados obtidos (292).

Para avaliar os efeitos citotóxicos ou protetores dos extratos nas células V79 e SH-SY5Y escolheu-se como agentes indutores de stress oxidativo o H_2O_2 e a rotenona, respetivamente. Foram avaliados os efeitos sobre a mitocôndria e a membrana celular.

A avaliação da redução do MTT é frequentemente usada para aferir o metabolismo mitocondrial e a atividade da cadeia respiratória das células em resposta a compostos e a nutrientes (293). O MTT (composto de coloração amarela) entra nas células por endocitose e, uma vez no seu interior, é metabolizado essencialmente pela succinato desidrogenase mitocondrial, que provoca a redução do anel tetrazólico deste sal, resultando na formação de cristais insolúveis de formazano, de cor azulada (294). Estes cristais são acumulados em compartimentos endossomais e/ou lipossomais, sendo posteriormente libertados no espaço extracelular por exocitose. Apenas as células viáveis têm capacidade para metabolizar o MTT (294).

A quantificação da LDH no meio extracelular permite avaliar a integridade da membrana e, conseqüentemente, a viabilidade celular em resposta a diferentes tipos de xenobióticos (295). A enzima citosólica LDH é rapidamente libertada das células danificadas para o sobrenadante da cultura de células, sendo a viabilidade celular inversamente proporcional à quantidade de enzima libertada (295).

De modo a tentar estabelecer uma relação entre a composição do extrato e a sua atividade foram também realizados ensaios com psoraleno e bergapteno, os quais aparecem em grande quantidade nos extratos analisados, principalmente de folhas.

6.3.1.2.1. Células V79

As células V79 são conhecidas por responder ao stress oxidativo constituindo um ótimo sistema para avaliar o potencial antioxidante de compostos (243). Assim, para estudar o efeito das folhas (o material vegetal com maior diversidade e abundância de compostos) de *F. carica*, cultivar “Pingo de Mel”, nas células foi usado extrato aquoso desta matriz numa gama de concentrações variando entre 0,4 e 1500 µg/mL. Inicialmente as células V79 foram expostas ao extrato durante 24h e avaliou-se o seu efeito na viabilidade celular pelo ensaio de redução do MTT. Nesta primeira abordagem o extrato aquoso de folhas não revelou qualquer efeito citotóxico (Figura 44).

Os ciclos de oxidação-redução do H₂O₂ originam a produção de [•]OH que, se não for intercetado, pode provocar dano celular. De modo a avaliar o possível efeito protetor deste extrato em situações de stress oxidativo, as células V79 foram expostas a 37,5 µM de H₂O₂ durante 30 min, uma vez que sob estas condições se verifica uma redução da viabilidade celular de cerca de 50%. Os resultados evidenciaram que nenhuma das concentrações testadas possui capacidade para proteger as células V79 sujeitas ao stress oxidativo. Adicionalmente, a concentração mais alta de extrato levou a um agravamento do efeito do H₂O₂ (Figura 44). Estes resultados são contraditórios relativamente aos obtidos nos ensaios químicos, principalmente para as concentrações mais elevadas, as quais revelaram efeito protetor contra as espécies reativas testadas [5.1, (73)]. Estudos anteriores demonstraram que o potencial antioxidante evidenciado nos ensaios químicos nem sempre é verificado em sistemas celulares (247), uma vez que a eficácia antioxidante dos extratos nas células depende não só da capacidade de captação dos radicais, mas também da lipofilia dos constituintes, do metabolismo celular, da interação com outras moléculas e do destino do radical formado a partir do antioxidante (296).

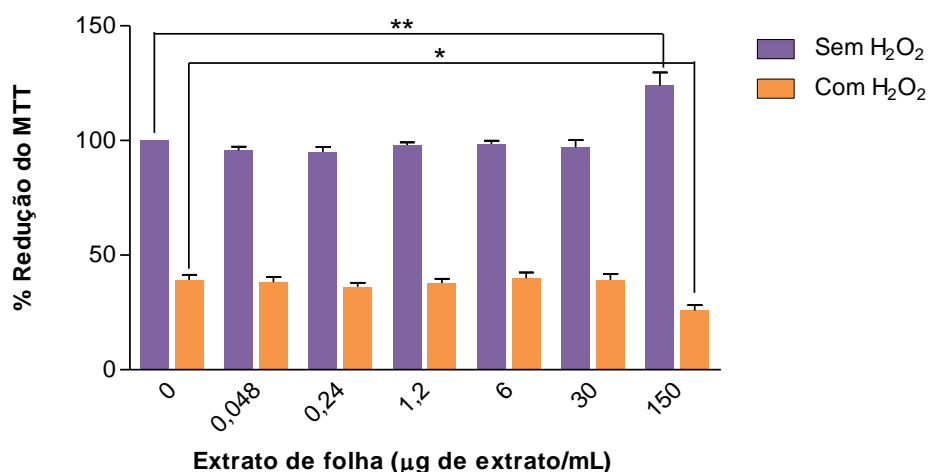


Figura 44. Efeito do extrato aquoso liofilizado de folhas de *F. carica* da cultivar “Pingo de Mel” na viabilidade de células V79, após 24 horas de tratamento, com e sem indução de stress oxidativo pelo H₂O₂. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ relativamente ao ensaio sem extrato.

Como o extrato aquoso não demonstrou efeito protetor a nível celular, foi avaliado o potencial de dois extratos orgânicos (extratos metanólico e de acetato de etilo) dos diversos materiais de *F. carica* [folhas e frutos (casca e polpa)].

Tal como observado com os extratos aquosos (Figura 44), os extratos das folhas obtidos com solventes orgânicos não revelaram ser citotóxicos no ensaio de redução do MTT (Figura 45), na gama de concentrações testadas. Por outro lado, os extratos orgânicos preparados a partir de cascas e polpas dos frutos mostraram uma tendência para serem citotóxicos, de modo dependente da concentração: com a exceção do extrato de acetato de etilo de cascas, os extratos orgânicos do fruto levaram a uma diminuição significativa da viabilidade celular para a concentração mais elevada (Figura 45).

Tendo em conta que estes extratos são constituídos por quantidades consideráveis de furanocumarinas, especialmente os extratos de acetato de etilo (Figura 34 e Tabela 15), o psoraleno e bergapteno foram testados nas mesmas condições numa gama de concentrações representativa do teor destes compostos nos referidos extratos, com o intuito de avaliar o seu possível papel na toxicidade exibida. Os resultados obtidos demonstram que para as concentrações testadas estes compostos não afetam a viabilidade celular (Figura 46). No entanto, é preciso ter em conta que, como os extratos são misturas complexas, os efeitos revelados não resultam da ação individual de cada composto, mas sim da ação de todos os seus constituintes e das interações entre eles. Sendo assim, para a diminuição da viabilidade celular não podem ser apenas

considerados os compostos fenólicos, uma vez que a presença de outros metabolitos que não foram determinados pode ter influência nos resultados.

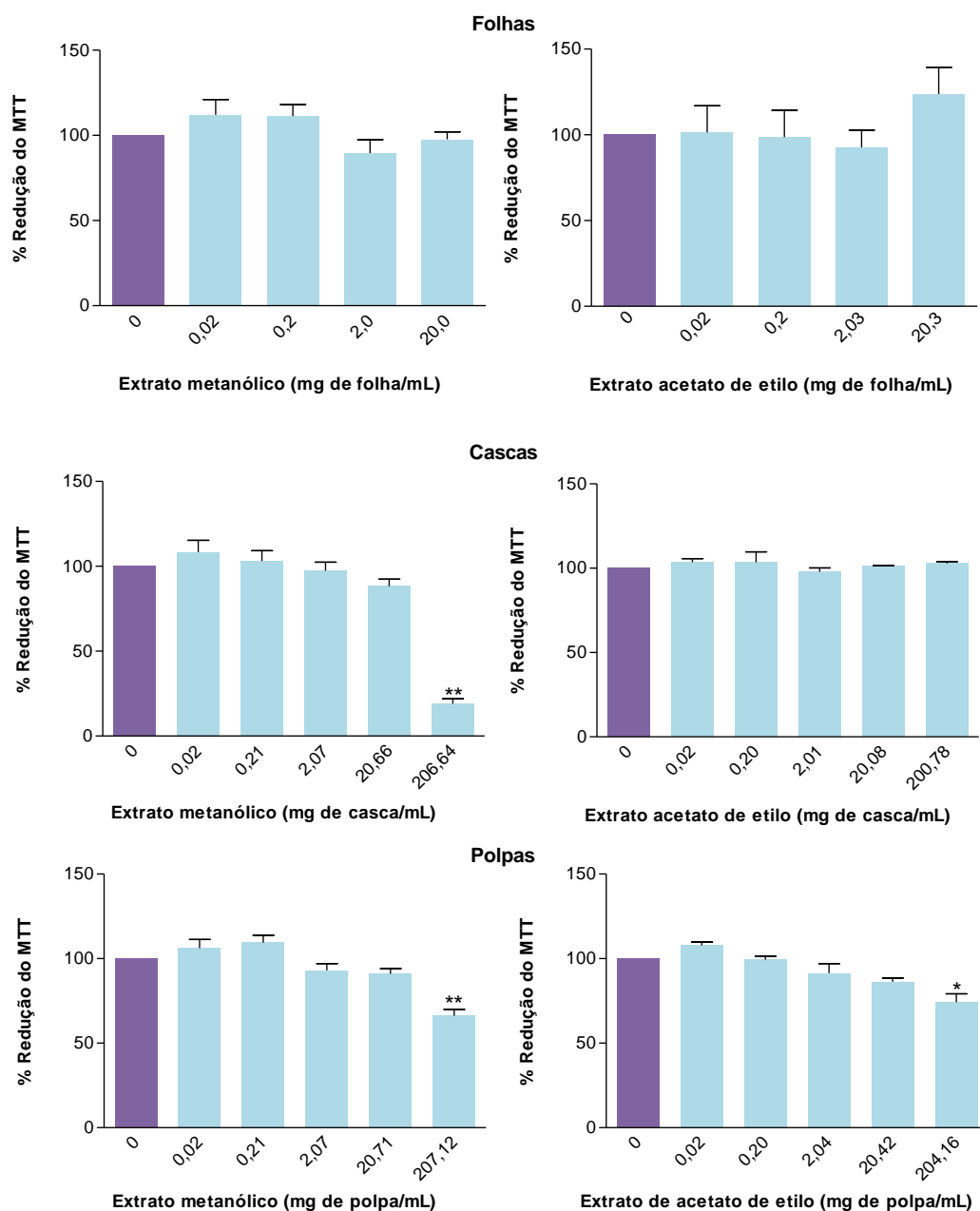


Figura 45. Efeito dos extratos metanólico e acetato de etilo de folhas e frutos (casca e polpa) da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* na viabilidade de células V79. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ relativamente ao ensaio sem extrato.

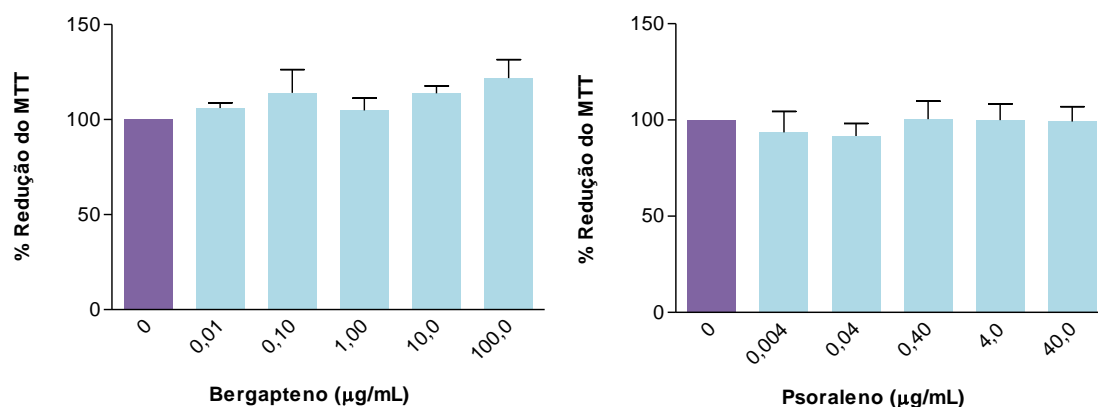


Figura 46. Efeito do bergapteno e psoraleno na viabilidade de células V79. Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado.

6.3.1.2.2. Células SH-SY5Y

No seguimento da avaliação dos efeitos dos extratos a nível celular, e com o intuito de alargar o conhecimento sobre o seu potencial, as células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram expostas ao extrato aquoso de folhas durante 24h. Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular demonstraram que o extrato aquoso não é citotóxico (Figura 47).

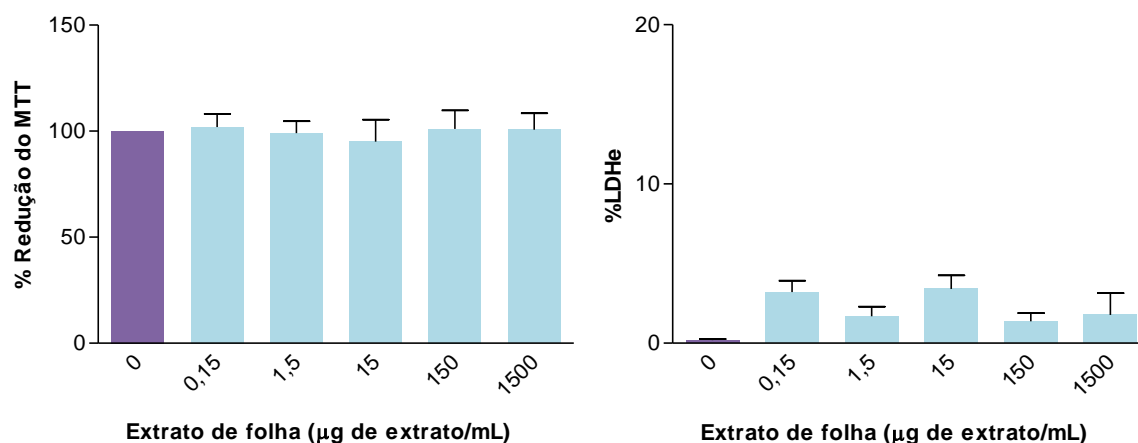


Figura 47. Efeito do extrato aquoso liofilizado de folhas da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* na viabilidade de células SH-SY5Y, avaliado através da redução do MTT e da libertação de LDH para o meio extracelular (LDHe). Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado.

Seguidamente as células SH-SY5Y foram incubadas com diferentes concentrações de um agente indutor de citotoxicidade, a rotenona (100 – 2000 nM) durante 24 horas. Este composto é um inibidor específico do complexo I mitocondrial e é um dos agentes

neurotóxicos mais comuns para avaliar *in vivo* o desenvolvimento da Doença de Parkinson (297). De facto, os resultados obtidos demonstraram que a exposição à rotenona provocou uma redução da viabilidade celular dependente da concentração, traduzida na diminuição da atividade mitocondrial e aumento da libertação da enzima citosólica LDH (Figura 48), tendo sido escolhida a concentração de 250 nM para a realização dos ensaios de proteção do extrato, a qual permite obter uma morte celular de cerca de 20%.

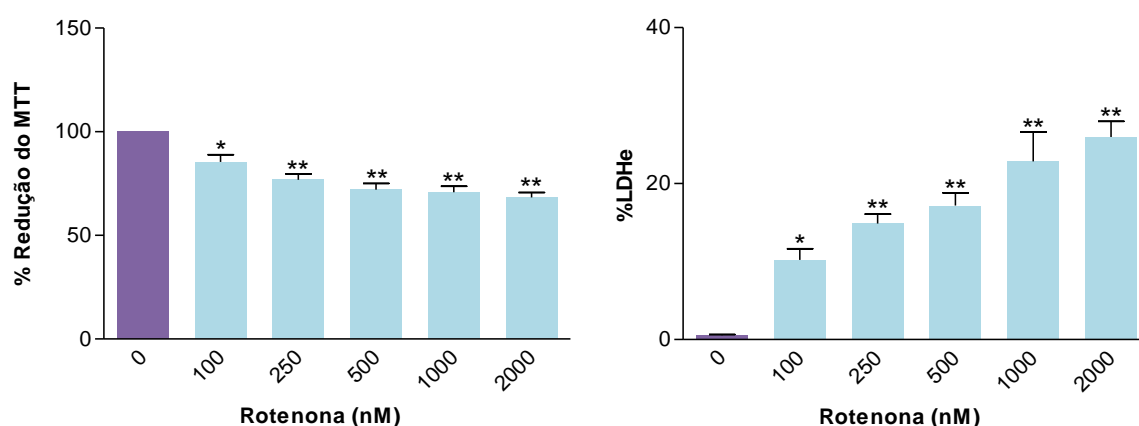


Figura 48. Efeito da rotenona na viabilidade de células SH-SY5Y, avaliado através da redução do MTT e da libertação de LDH para o meio extracelular (LDHe). Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ relativamente ao ensaio sem rotenona.

Quando as células foram expostas a diferentes concentrações de extrato e rotenona não se observou qualquer efeito de proteção celular (Figura 49). Verificou-se um agravamento dos efeitos tóxicos no ensaio da redução do MTT, mas não na libertação da LDH.

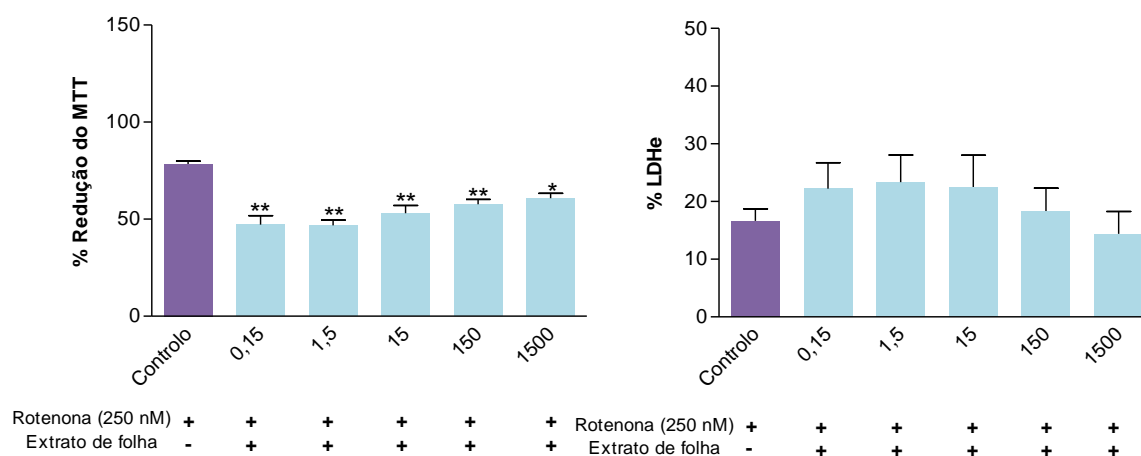


Figura 49. Efeito do extrato aquoso liofilizado de folhas da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* + rotenona na viabilidade de células SH-SY5Y, avaliado através da redução do MTT e da libertação de LDH para o meio extracelular (LDHe). Os valores obtidos representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ relativamente ao controlo.

Tendo em conta os resultados obtidos, foram realizados estudos preliminares para avaliar a genotoxicidade do extrato aquoso de folhas por si só e na presença de rotenona.

A genotoxicidade pode ser definida como a capacidade que algumas substâncias têm para induzir alterações no material genético dos organismos a elas expostos (298). Estas substâncias, para além de terem efeitos nocivos sobre diversas moléculas reguladoras do crescimento celular normal, podem provocar mutações nas células levando à sua divisão e crescimento descontrolado (299).

No âmbito do nosso estudo foi realizado o ensaio do cometa, o qual é aplicado a células de mamíferos, permitindo identificar padrões de migração eletroforética do DNA. A observação de uma “cauda” no DNA significa que este se encontra danificado e, de um modo geral, quanto mais longa e brilhante for a cauda, maiores são os danos (299).

Neste estudo foi avaliada a intensidade da cauda do cometa (Figura 50). Os resultados obtidos sugerem que o extrato por si só não revela qualquer efeito genotóxico na concentração de 1,5 mg/mL (Figura 50B e Figura 51). Contrariamente, tal como descrito por outros autores (300), a rotenona provocou efeitos tóxicos no DNA conduzindo a um aumento da intensidade da cauda relativamente ao controlo (Figura 50C e Figura 51). Adicionalmente, os resultados obtidos indicam um efeito protetor do extrato contra o dano no DNA induzido pela rotenona (Figura 50D e Figura 51).

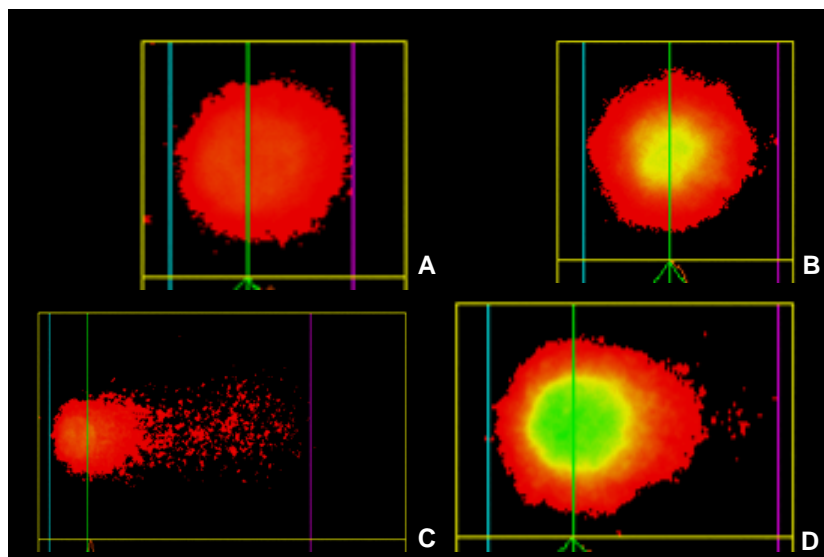


Figura 50. Ensaio do cometa em células SH-SY5Y. A) Células não tratadas; B) células tratadas com extrato de folhas da cultivar “Pingo de Mel” de *F. carica* (1,5 mg/mL); C) células expostas à rotenona (250 nM); D) células tratadas com extrato de folhas de *F. carica* (1,5 mg/mL) e expostas à rotenona (250 nM).

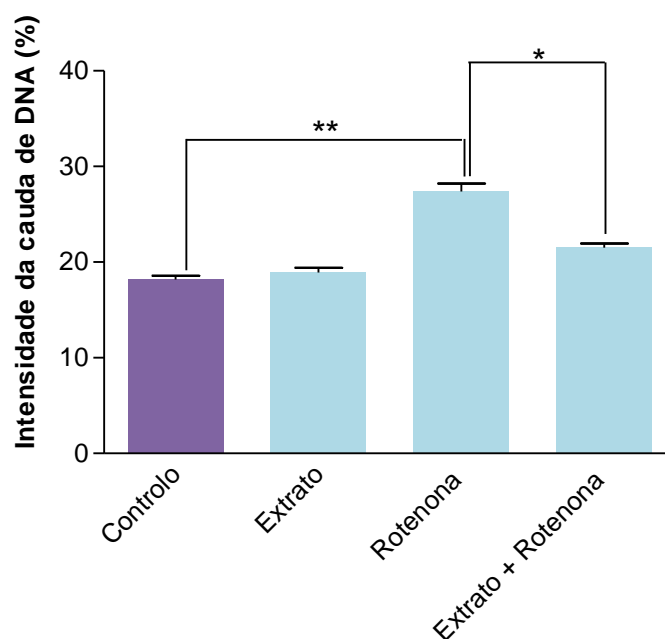


Figura 51. Efeito do extrato aquoso de folhas (1,5 mg/mL) de *F. carica* na intensidade da cauda do DNA em células SH-SY5Y expostas à rotenona (250nM). Os resultados são expressos como a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes realizados em triplicado; * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$.

6.3.2. Inibição da acetilcolinesterase

O sistema colinérgico central é importante na regulação das funções cognitivas. As várias estratégias de tratamento da DA têm-se baseado na hipótese colinérgica e uma das aproximações mais promissoras para o seu tratamento é prolongar a disponibilidade de acetilcolina na fenda sináptica, usando inibidores das colinesterases (236, 237).

Existem vários ensaios para avaliação da capacidade para inibir estas enzimas, sendo a determinação espectrofotométrica baseada no método de Ellman o ensaio *in vitro* mais utilizado (301, 302).

Foi avaliado o potencial dos extratos aquosos das folhas e frutos (cascas e polpas) das cultivares brancas de *F. carica*, “Pingo de Mel” e “Branca Tradicional”, bem como do látex da primeira cultivar para inibir a AChE. Os diferentes tecidos vegetais não mostraram qualquer capacidade para inibir esta enzima e o látex apresentou uma inibição máxima de 10% para a concentração mais elevada testada (5,317 mg/mL) [(5.1, 5.4) (73, 103)].

Atendendo à presença de quercetina-3-O-rutinósido, psoraleno, bergapteno e terpenos nos extratos das folhas e frutos (cascas e polpas) seria de esperar uma ação inibitória sobre a AChE (234). Contudo, tal não foi verificado, o que pode estar relacionado com a existência de efeitos antagónicos entre os diferentes compostos presentes nos extratos (303).

6.3.3. Atividade antimicrobiana

As plantas contêm um grande número de compostos que são reconhecidos por retardar ou inibir o crescimento de bactérias, leveduras e fungos (304, 305). O aparecimento de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos tem vindo a aumentar consideravelmente, preocupando os responsáveis pelos serviços de saúde em todo o mundo. Assim, a procura de agentes antibacterianos a partir de plantas tem aumentado exponencialmente nos últimos anos. A principal vantagem da utilização advém da grande variedade de compostos, o que dificulta potencialmente a resistência desenvolvida pelos microrganismos que, como já foi referido anteriormente, se observa com a utilização a longo prazo de antibióticos sintéticos (306).

O potencial antibacteriano dos extratos aquosos liofilizados das folhas, cascas e polpas das cultivares brancas “Pingo de Mel” e “Branca Tradicional” foi avaliado contra três espécies Gram + (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e duas Gram – (*Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*). Apesar dos

extratos serem ricos em diversos compostos reconhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas, nomeadamente compostos fenólicos, não foi observada atividade antibacteriana nas concentrações de extrato testadas (1,5 mg/mL para as folhas e 50 mg/mL para as cascas e polpas) [5.1, (73)]. Limitações relacionadas com a solubilidade das amostras não permitiram que fossem testadas concentrações superiores.

7. CONCLUSÕES

Com o trabalho realizado no âmbito desta dissertação incrementou-se o conhecimento de diversos materiais de cultivares Portuguesas de *F. carica*. Os resultados obtidos permitiram chegar às seguintes conclusões:

1. A espécie *F. carica* constitui uma boa fonte de ácidos orgânicos, sendo as folhas o material mais rico nestes metabolitos;
2. Cada material apresentou um perfil de ácidos orgânicos distinto, sugerindo que este possa ter interesse no seu controlo de qualidade. O ácido málico foi o composto maioritário em todos os materiais;
3. No látex de *F. carica* predominam os ácidos gordos saturados, sendo os ácidos araquídico e palmítico os metabolitos mais abundantes;
4. O látex de *F. carica* é essencialmente constituído por aminoácidos não essenciais. Os aminoácidos mais abundantes são a cisteína e tirosina;
5. Foram identificados 3 ácidos hidroxicinâmicos, 2 heterósidos de flavonóis e 2 furanocumarinas, sendo as folhas o material com maior diversidade e quantidade de compostos fenólicos;
6. De modo geral, para todas as matrizes, nos extratos aquosos os flavonoides predominam sobre os ácidos hidroxicinâmicos e furanocumarinas. Contrariamente, nos extratos metanólico e de acetato de etilo verifica-se que as furanocumarinas são os compostos mais abundantes;
7. O perfil qualitativo de fitosteróis do látex e das folhas é semelhante. Em termos quantitativos, o látex é nitidamente o material com maior quantidade destes compostos, sendo o β -sitosterol o predominante. As folhas são essencialmente constituídas por lanosterol;
8. Foram detetados 68 compostos voláteis e semi-voláteis, que incluem aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres, monoterpenos, sesquiterpenos e norisoprenóides;

9. As folhas são o material com maior diversidade de compostos voláteis, sendo os sesquiterpenos a classe química predominante. Nos frutos (cascas e polpas), os aldeídos e monoterpenos constituem as classes químicas principais;
10. Alguns compostos voláteis são característicos de determinado material e/ou cultivar, podendo assumir um papel importantes como marcadores de matriz;
11. De modo geral, o conteúdo de compostos fenólicos e de fitosteróis não está correlacionado com a diversidade genética das diferentes cultivares;
12. As folhas e o látex de *F. carica* foram as matrizes que revelaram ter um maior potencial antioxidante em sistemas químicos, o que não foi confirmado em sistemas celulares;
13. De modo geral, os extratos aquosos, metanólicos e de acetato de etilo das folhas e frutos (cascas e polpas) de *F. carica* por si só não são citotóxicos para células V79 e SH-SY5Y;
14. O extrato aquoso de folhas de *F. carica* não revelou ser genotóxico para as células SH-SY5Y e demonstrou uma tendência para proteger estas células da toxicidade induzida pela rotenona;
15. A variedade de compostos e o potencial antioxidante revelados apontam para o interesse no incremento do consumo de tecidos vegetais de *F. carica*, bem como no uso do seu produto de secreção como fonte de compostos bioativos.

PARTE IV
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Makkar HPS, Sidhuraju P, Becker K. Plant secondary metabolites: Humana Press; 2010.
2. WHO. Global strategy on diet, physical activity and health. Geneva: World Health Organization; 2004.
3. Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Patch C, Sullivan DR, Fenech MF, et al. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. Med J Aust 2006 Jun; 185 (4): S4-S24.
4. Liu RH. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. J Nutr 2004 Dec; 134 (12): 3479S-85S.
5. WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: World Health Organization; 2003.
6. Lairon D. Intervention studies on Mediterranean diet and cardiovascular risk. Mol Nutr Food Res 2007 Oct; 51 (10): 1209-14.
7. Pedro JG. Carta de distribuição de figueira e medronheiro - Notícia explicativa. Lisboa: Direcção-Geral do Ambiente; 1994.
8. Coutinho AXP. Flora de Portugal. 2^a ed. Lisboa: Bertrand (Irmãos) Ltd; 1939.
9. Kjellberg F, Jousselin, E., Hossaert-McKey, M., Rasplus, J.-Y. Biology, ecology and evolution of fig-pollinating wasps (Chalcidoidea, Agaonidae). In: Raman A, Schaefer, C. W., Withers, T. M., editor. Biology, Ecology and Evolution of Gallindicuing Arthropods Science Publisher, Inc; 2005. p. 539-72.
10. Lansky EP, Paavilainen HM. Figs: Taylor & Francis; 2009.
11. Gonçalves Ferreira FA. Alimentos do 5º grupo. Nutrição Humana. Lisboa: Fundação Calouste Glubenkian; 1994.
12. Vinson JA, Zubik L, Bose P, Samman N, Proch J. Dried Fruits: Excellent *in vitro* and *in vivo* antioxidants. J Am Coll Nutr 2005 Feb; 24 (1): 44-50.
13. INE. Estatísticas Agrícolas 2010. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P.; 2011.
14. INE. Estatísticas Agrícolas 2009. Lisboa: Instituto Nacional de Estatística, I.P.; 2010.

15. Trapp S, Croteau R. Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annu Rev Plant Biol* 2001 Jun; 52 (1): 689-724.
16. Taiz L, Zeiger E. *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc; 2002.
17. Hagel J, Facchini P. Plant metabolomics: analytical platforms and integration with functional genomics. *Phytochem Rev* 2008 Oct; 7 (3): 479-97.
18. Fiehn O. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Comp Funct Genomics* 2001 Jun; 2 (3): 155-68.
19. Dashek WV, Micales JA. Isolation, separation, and characterization of organic acids. In: *Methods in plant biochemistry and molecular biology*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1997. p. 107-13.
20. López-Bucio J, Nieto-Jacobo MaF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci* 2000 Dec; 160 (1): 1-13.
21. Seabra RM, Andrade PB, Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Bastos ML. Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In: Fingerman M NR, editor. *Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms*. Enfield (NH) USA: Science 2006. p. 115-74.
22. Silva BM, Andrade PB, Mendes GC, Seabra RM, Ferreira MA. Study of the organic acids composition of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit and jam. *J Agric Food Chem* 2002 Mar; 50 (8): 2313-7.
23. Lee HS. HPLC method for separation and determination of nonvolatile organic acids in orange juice. *J Agric Food Chem* 1993 Nov; 41 (11): 1991-3.
24. Matthey M. The Production of organic acids. *Crit Rev Biotechnol* 1992 Jan; 12 (1): 87-132.
25. Libert B, Franceschi VR. Oxalate in crop plants. *J Agric Food Chem* 1987 Nov; 35 (6): 926-38.
26. Harborne JB, Baxter H, Moss GP. *Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants*. 2nd ed: Taylor & Francis; 1999.

27. Pero RW, Lund H, Leanderson T. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytother Res* 2009 Mar; 23 (3): 335-46.
28. Schulze J, Tesfaye M, Litjens RHMG, Bucciarelli B, Trepp G, Miller S, et al. Malate plays a central role in plant nutrition. *Plant Soil* 2002 Nov; 247 (1): 133-9.
29. Sturm K, Koron D, Stampar F. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. *Food Chem* 2003 Nov; 83 (3): 417-22.
30. Ribeiro B, Rangel J, Valentão Pc, Andrade PB, Pereira JA, Bölke H, et al. Organic acids in two Portuguese chestnut (*Castanea sativa* Miller) varieties. *Food Chem* 2007; 100 (2): 504-8.
31. Pérez AG, Olías R, Espada J, Olías JM, Sanz C. Rapid determination of sugars, nonvolatile acids, and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *J Agric Food Chem* 1997 Sep; 45 (9): 3545-9.
32. Simpson NJK. Solid-phase extraction: principles, techniques and applications. New York: Marcel Dekker; 2000.
33. Theron MM, Lues JF. Organic acids and food preservation: Taylor and Francis; 2009.
34. Papadoyannis IN, Samanidou VF. Sample Preparation for HPLC. Encyclopedia of chromatography. 3rd ed. Thessaloniki: Taylor & Francis Group; 2009.
35. Andrade PB, Seabra RM. Phenolic compounds, analysis by HPLC. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002.
36. Shiraishi S-C, Kawakami K, Widodo SE, Shiraishi M, Kitazaki M. Organic acid profile in the juice of fig fruits. *Journal of the Faculty of Agriculture - Kyushu University* 1996 Nov; 41 (1-2): 29-33.
37. Belitz HD, Grosch W. Amino acids, peptides and proteins. In: *Food Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag; 1999. p. 8-34.
38. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, Tietz NW. Tietz fundamentals of clinical chemistry. 6th ed. California: Saunders Elsevier; 2008.
39. Voet D, Voet JG. Biochemistry. 4th ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010.

40. Meletis CD, Barker JE. Therapeutic uses of aminoacids. *Alternative & Complementary Therapies* 2005 Feb; 11 (1): 24-8.
41. Schaechter M. Desk encyclopedia of microbiology. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 2009.
42. Styler L. Biochemistry. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 1995.
43. Nollet LML. Food analysis by Hplc. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2000.
44. Muramoto K, Hisao K. Analyses of dansyl and dabsyl amino acids by reverse phase high-performance liquid chromatography. *B Jpn Soc Sci Fish* 1985 Nov; 51 (5): 817-24.
45. Senyuva HZ, Gilbert J, Ozturkoglu S, Ozcan S, Gurel N. Changes in free amino acid and sugar levels of dried figs during aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J Agric Food Chem* 2008 Oct; 56 (20): 9661-6.
46. McNaught A, Wilkinson A. International Union of Pure and Applied Chemistry Compendium of Chemical Terminology-The Gold Book. 2009.
47. Ohlrogge JB, Jaworski JG. Regulation of fatty acids synthesis. *Annu Rev Plant Biol* 1997 Jun; 48: 109-36.
48. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids - dietary fats: total fats and fatty acids. [Consultado em 03/05/2012]; Disponível em: http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=10490.
49. Ha YL, Storkson J, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res* 1990 Feb; 50 (4): 1097-101.
50. Yu L, Adams D, Gabel M. Conjugated linoleic acid isomers differ in their free radical scavenging properties. *J Agric Food Chem* 2002 May; 50 (14): 4135-40.
51. Kinsella JE, Lokesh B, Stone RA. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1990 Jul; 52 (1): 1-28.
52. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002 Nov; 106 (21): 2747-57.

53. Nageswari K, Banerjee R, Menon VP. Effect of saturated, omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infarction. *J Nutr Biochem* 1999 Jun; 10 (6): 338-44.
54. Sarsilmaz M, Songur A, Özyurt H, Kuş İ, Özen OA, Özyurt B, et al. Potential role of dietary ω -3 essential fatty acids on some oxidant/antioxidant parameters in rats' corpus striatum. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent Fatty Acids* 2003 Oct; 69 (4): 253-9.
55. Cunnane S, Griffin B. Nutrition and metabolism of lipids. In: Gibney MJ VH, Kok FJ, editor. *Introduction to human nutrition*. Oxford: Blackwell Publishing; 2009. p. 86-121.
56. Somashekar D, Venkateshwaran G, Srividya C, Krishnanand K, Sambaiah K, Lokesh BR. Efficacy of extraction methods for lipid and fatty acid composition from fungal cultures. *World J Microb Biot* 2001 Apr; 17 (3): 317-20.
57. Moldoveanu Ş, David V. *Sample preparation in chromatography*. Amsterdam: Elsevier; 2002.
58. León-Guzmán MF, Silva I, López MG. Proximate chemical composition, free amino acid contents, and free fatty acid contents of some wild edible mushrooms from Queretaro, Mexico. *J Agric Food Chem* 1997 Nov; 45 (11): 4329-32.
59. Jeong WS, Lachance PA. Phytosterols and fatty acids in fig (*Ficus carica*, var. Mission) fruit and tree components. *J Food Sci* 2001 Mar; 66 (2): 278-81.
60. Pande G, Akoh CC. Organic acids, antioxidant capacity, phenolic content and lipid characterisation of Georgia-grown underutilized fruit crops. *Food Chem* 2010 Jun; 120 (4): 1067-75.
61. Ribechini E, Pérez-Arantegui J, Colombini MP. Gas chromatography/mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry for the chemical characterisation of modern and archaeological figs (*Ficus carica*). *J Chromatogr A* 2011 Jun; 1218 (25): 3915-22.
62. Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Bonesi M, Duez P, Conforti F. Changes in the phenolic and lipophilic composition, in the enzyme inhibition and antiproliferative activity of *Ficus carica* L. cultivar Dottato fruits during maturation. *Food Chem Toxicol* 2012 Mar; 50 (3-4): 726-33.
63. Harborne J, Dey P. *Plant biochemistry*. London: Academic Press; 1997.

64. Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plants médicinales. Paris: Editions Tec & Doc; 1999.
65. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J Agric Food Chem* 2000 Feb; 48 (3): 577-99.
66. Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. Paris: Dunod; 1968.
67. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998 Nov; 56 (11): 317-33.
68. Barbaste M, Berke B, Dumas M, Soulet S, Delaunay JC, Castagnino C, et al. Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. *J Nutr Health Aging* 2002 May; 6 (3): 209-23.
69. Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr* 2005 Jan; 81 (1 Suppl): 317S-25S.
70. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004 May 79 (5): 727-47.
71. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002 Jan; 22: 19-34.
72. Macheix J-J, Fleuriet A, Billot J. The main phenolics of fruits. In *Fruit phenolics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc; 1999.
73. Cseke LJ. Natural products from plants. 2nd ed: CRC/Taylor & Francis; 2006.
74. Floss HG, Onderka DK, Carroll M. Stereochemistry of the 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthetase reaction and the chorismate synthetase reaction. *J Biol Chem* 1972 Feb; 247 (3): 736-44.
75. Bender SL, Mehdi S, Knowles JR. Dehydroquinase synthase: the role of divalent metal cations and of nicotinamide adenine dinucleotide in catalysis. *Biochemistry* 1989 Sep; 28 (19): 7555-60.
76. Harris JM, Gonzalez-Bello C, Kleanthous C, Hawkins AR, Coggins JR, Abell C. Evidence from kinetic isotope studies for an enolate intermediate in the mechanism of type II dehydroquinases. *Biochem J* 1996 Oct; 319 (Pt 2): 333-6.

77. Jakeman DL, Mitchell DJ, Shuttleworth WA, Evans JNS. On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochemistry* 1998 Sep; 37 (35): 12012-9.
78. Lewis J, Johnson KA, Anderson KS. The catalytic mechanism of EPSP synthase revisited. *Biochemistry* 1999 Jun; 38 (22): 7372-9.
79. Cotton RGH, Gibson F. The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine; enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationships to prephenate dehydratase and prephenate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1965 Apr; 100 (1): 76-88.
80. Cerutti P, Guroff G. Enzymatic formation of phenylpyruvic acid in *Pseudomonas* sp. (ATCC 11299a) and its regulation. *J Biol Chem* 1965 Jul; 240 (7): 3034-8.
81. Mavrides C, Orr W. Multispecific aspartate and aromatic amino acid aminotransferases in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1975 Jun; 250 (11): 4128-33.
82. Koukol J, Conn EE. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J Biol Chem* 1961 Oct; 236 (10): 2692-8.
83. Teutsch HG, Hasenfratz MP, Lesot A, Stoltz C, Garnier JM, Jeltsch JM, et al. Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 May; 90 (9): 4102-6.
84. Ehltling J, Shin JJ, Douglas CJ. Identification of 4-coumarate:coenzyme A ligase (4CL) substrate recognition domains. *Plant J* 2001 Sep; 27 (5): 455-65.
85. Taveira M, Fernandes F, Valentão P, Ferreres F, Andrade PB. Plant herbivores: bioactive metabolites besides the pest. In: Sridhar K, editor. *Aquatic plants and plant diseases*. USA: Nova Science Publishers; 2011. p. 117-45.
86. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004 Jan; 39 (1): 1-15.
87. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 2000 Jun; 54 (3): 237-56.
88. Jez JM, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP. Structure and mechanism of the evolutionarily unique plant enzyme chalcone isomerase. *Nat Struct Mol Biol* 2000 Sep; 7 (9): 786-91.

89. Paolocci F, Bovone T, Tosti N, Arcioni S, Damiani F. Light and an exogenous transcription factor qualitatively and quantitatively affect the biosynthetic pathway of condensed tannins in *Lotus corniculatus* leaves. J Exp Bot 2005 Apr; 56 (414): 1093-103.
90. Holton TA, Brugliera F, Tanaka Y. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. Plant J 1993 Dec; 4 (6): 1003-10.
91. Nakajima J, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K. Reaction mechanism from leucoanthocyanidin to anthocyanidin 3-glucoside, a key reaction for coloring in anthocyanin biosynthesis. J Biol Chem 2001 Jul; 276 (28): 25797-803.
92. Saito K, Kobayashi M, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M. Direct evidence for anthocyanidin synthase as a 2-oxoglutarate-dependent oxygenase: molecular cloning and functional expression of cDNA from a red forma of *Perilla frutescens*. Plant J 1999 Jan; 17 (2): 181-9.
93. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. Curr Med Chem 2005 Apr; 12 (8): 887-916.
94. Bourgaud F, Hehn A, Larbat R, Doerper S, Gontier E, Kellner S, et al. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. Phytochem Rev 2006 Jun; 5 (2): 293-308.
95. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents 2005 Jan; 5 (1): 29-46.
96. Kostova I, Bhatia S, Grigorov P, Balkansky S, Parmar VS, Prasad AK, et al. Coumarins as antioxidants. Curr Med Chem 2011 Sep; 18 (25): 3929-51.
97. Floss H-G, Mothes U. On the biosynthesis of furocoumarins in *Pimpinella magna*. Phytochemistry 1966 Jan; 5 (1): 161-9.
98. Hamerski D, Matern U. Elicitor-induced biosynthesis of psoralens in *Ammi majus* L. suspension cultures. Microsomal conversion of demethylsuberosin into (+) marmesin and psoralen. Eur J Biochem 1988 Jan; 171 (1-2): 369-75.
99. Wendorff H, Matern U. Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. Microsomal conversion of (+) marmesin into psoralen. Eur J Biochem 1986 Dec; 161 (2): 391-8.

100. Naczki M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2006 Aug; 41 (5): 1523-42.
101. Stalikas CD. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 2007 Dec; 30 (18): 3268-95.
102. Andrade PB, Pereira DM, Valentão P. Phenolic compounds: analysis by HPLC. In: Cazes J, editor. *Encyclopedia of Chromatography*. New York: Taylor & Francis LLC; 2010. p. 1768-76.
103. Ferreres F, Tomas-Lorente F, Barberan FAT. Current trends in plant flavonoid analysis. Amsterdam: Elsevier; 1989.
104. de Rijke E, Zappey H, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments. *J Chromatogr A* 2003 Jan; 984 (1): 45-58.
105. Cuyckens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002 Dec; 16 (24): 2341-8.
106. de Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J Chromatogr A* 2006 Apr; 1112 (1-2): 31-63.
107. Ferreres F, Fernandes F, Oliveira JM, Valentao P, Pereira JA, Andrade PB. Metabolic profiling and biological capacity of *Pieris brassicae* fed with kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*). *Food Chem Toxicol* 2009 Jun; 47 (6): 1209-20.
108. Van Sumere CF. Phenols and phenolic acids. In: Van Sumere CF, editor. *Methods in plant biochemistry*. London: Academic Press; 1989. p. 29-73.
109. Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. *Methods in ecology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994.
110. He XG. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *J Chromatogr A* 2000 Jun; 880 (1-2): 203-32.

111. Markham KR. Techniques of flavonoid identification. 1st ed. London: Academic Press; 1982.
112. Markham KR. Flavones, flavonols and their glycosides. In: Dey PM, Harborne JB, editors. Methods in Plant Biochemistry 1989. p. 197-235.
113. Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias ACP. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. Food Chem 2005 Mar; 90 (1–2): 157-67.
114. Nielsen JK, Nørbæk R, Olsen CE. Kaempferol tetraglucosides from cabbage leaves. Phytochemistry 1998 Dec; 49 (7): 2171-6.
115. Xu R, Ye Y, Zhao W. Introduction to natural products chemistry. Boca Raton, Florida: Taylor and Francis; 2011.
116. Krishnan P, Kruger NJ, Ratcliffe RG. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. J Exp Bot 2005 Jan; 56 (410): 255-65.
117. Dunn WB. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. Phys Biol 2008 Mar; 5 (1): 011001.
118. Ferreres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. J Mass Spectrom 2004 Mar; 39 (3): 312-21.
119. Ferreres F, Taveira M, Pereira DM, Valentao P, Andrade PB. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) seeds: new flavonols and cytotoxic effect. J Agric Food Chem 2010 Mar; 58 (5): 2854-61.
120. Hughes RJ, Croley TR, Metcalfe CD, March RE. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. Int J Mass Spectrom 2001 Sep; 210–211: 371-85.
121. Lee JS, Kim DH, Liu KH, Oh TK, Lee CH. Identification of flavonoids using liquid chromatography with electrospray ionization and ion trap tandem mass spectrometry with an MS/MS library. Rapid Commun Mass Spectrom 2005 Dec; 19 (23): 3539-48.

122. Hostettmann K, Hostettmann M. Xanthones. In: Harborne JB, editor. Plant phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 493-508.
123. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. 1st ed. Heidelberg: Springer-Verlag; 1970.
124. Veberic R, Colaric M, Stampar F. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. Food Chem 2008 Jan; 106 (1): 153-7.
125. Vallejo F, Marín JG, Tomás-Barberán FA. Phenolic compound content of fresh and dried figs (*Ficus carica* L.). Food Chem 2012 Feb; 130 (3): 485-92.
126. Teixeira DM, Patão RF, Coelho AV, da Costa CT. Comparison between sample disruption methods and solid-liquid extraction (SLE) to extract phenolic compounds from *Ficus carica* leaves. J Chromatogr A 2006 Jan; 1103 (1): 22-8.
127. Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD, Newman RA. *Ficus* spp. (fig): Ethnobotany and potential as anticancer and anti-inflammatory agents. J Ethnopharmacol 2008 Sep; 119 (2): 195-213.
128. Vaya J, Mahmood S. Flavonoid content in leaf extracts of the fig (*Ficus carica* L.), carob (*Ceratonia siliqua* L.) and pistachio (*Pistacia lentiscus* L.). Biofactors 2006 Dec; 28 (3-4): 169-75.
129. Ali B, Mujeeb M, Aeri V, Mir SR, Ahmad S, Siddique NA, et al. High-performance thin layer chromatographic quantification of bioactive psoralen and daidzein in leaves of *Ficus carica* L. Nat Prod Res 2011 Oct; 25 (17): 1666-70.
130. Oomah BD, Mazza G. Health benefits of phytochemicals from selected Canadian crops. Trends Food Sci Tech 1999 Dec; 10 (6-7): 193-8.
131. Fernandes P, Cabral JMS. Phytosterols: applications and recovery methods. Bioresour Technol 2007 Sep; 98 (12): 2335-50.
132. Phillips KM, Ruggio DM, Toivo JI, Swank MA, Simpkins AH. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. J Food Compos Anal 2002 Apr; 15 (2): 123-42.
133. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi A-M. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J Sci Food Agric 2000 May; 80 (7): 939-66.

134. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* 2002 Nov; 41 (6): 457-500.
135. Lagarda MJ, Garcia-Llatas G, Farre R. Analysis of phytosterols in foods. *J Pharm Biomed Anal* 2006 Aug; 41 (5): 1486-96.
136. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis: CRC Press; 2010.
137. Rubnov S, Kashman Y, Rabinowitz R, Schlesinger M, Mechoulam R. Suppressors of cancer cell proliferation from fig (*Ficus carica*) resin: isolation and structure elucidation. *J Nat Prod* 2001 Jul; 64 (7): 993-6.
138. Sawyer NA, Chambers SM, Cairney JW. Variation in nitrogen source utilisation by nine *Amanita muscaria* genotypes from Australian *Pinus radiata* plantations. *Mycorrhiza* 2003 Aug; 13 (4): 217-21.
139. Dudareva N, Negre F, Nagegowda DA, Orlova I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Crit Rev Plant Sci* 2006 Oct; 25 (5): 417-40.
140. Maffei ME. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *S Afr J Bot* 2010 Oct; 76 (4): 612-31.
141. Zawirska-Wojtasiak R. Optical purity of (R)-(-)-1-octen-3-ol in the aroma of various species of edible mushrooms. *Food Chem* 2004 Jun; 86 (1): 113-8.
142. Díaz P, Ibáñez E, Señoráns FJ, Reglero G. Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 2003 Oct; 1017 (1-2): 207-14.
143. Jélen HH. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Lett Appl Microbiol* 2003 May; 36 (5): 263-7.
144. Kloer DP, Schulz GE. Structural and biological aspects of carotenoid cleavage. *Cell Mol Life Sci* 2006 Oct; 63 (19-20): 2291-303.
145. Schwab W, Davidovich-Rikanati R, Lewinsohn E. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J* 2008 May; 54 (4): 712-32.

146. Springob K, Kutchan TM. Introduction to the different classes of natural products. In: Osbourn AE, Lanzotti V, editors. Plant-derived natural products: synthesis, function, and application. Campobasso, Italy: Springer; 2009. p. 35.
147. Feussner I, Wasternack C. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 2002 Jun; 53 (1): 275-97.
148. Matsui K. Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2006 Jun; 9 (3): 274-80.
149. Loreto F, Barta C, Brillì F, Nogues I. On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. *Plant Cell Environ* 2006 Sep; 29 (9): 1820-8.
150. Seo HS, Song JT, Cheong J-J, Lee Y-H, Lee Y-W, Hwang I, et al. Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Nat Acad Sci* 2001 Apr 10; 98 (8): 4788-93.
151. Krumm T, Bandemer K, Boland W. Induction of volatile biosynthesis in the lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signalling pathway. *FEBS Lett* 1995 Dec; 377 (3): 523-9.
152. Rodriguez-Bustamante E, Sanchez S. Microbial production of C13-norisoprenoids and other aroma compounds via carotenoid cleavage. *Crit Rev Microbiol* 2007 Jul; 33 (3): 211-30.
153. Guedes de Pinho P, Pereira DM, Gonçalves RF, Valentão P, Fernandes F, Taveira M, et al. Head-space-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry applied to determination of volatiles in natural matrices. In: JA TdS, editor. *Functional Plant Science & Biotechnology*. UK: Global Science Books; 2009. p. 1-15.
154. Prosen H, Zupančič-Kralj L. Solid-phase microextraction. *TrAC Trend Anal Chem* 1999 Apr; 18 (4): 272-82.
155. Pawliszyn J. Solid phase microextraction: theory and practice. New York: Wiley-VCH; 1997.

156. Alpendurada F M. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. J Chromatogr A 2000 Aug; 889 (1–2): 3-14.
157. Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. J Chromatogr A 2000 Nov; 902 (1): 167-94.
158. Cruz C, Noël-Suberville C, Montury M. Fatty acid content and some flavor compound release in two strains of *Agaricus bisporus*, according to three stages of development. J Agric Food Chem 1997 Jan; 45 (1): 64-7.
159. Hites RA. Gas chromatography mass spectrometry. In: Settle FA, editor. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Virginia: National Science Foundation; 1997. p. 609-26.
160. Pombeiro ALJO. Técnicas e operações unitárias em química laboratorial. 2nd ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1991.
161. McNair HM, Miller JM. Basic Gas Chromatography (Techniques in Analytical Chemistry). 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009.
162. Watson JT, Sparkman OD. Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation. 4th ed. West Sussex: John Wiley & Sons; 2007.
163. Gozlekci S, Kafkas E, Ercisli S. Volatile compounds determined by HS/GC-MS technique in peel and pulp of fig (*Ficus carica* L.) cultivars grown in mediterranean region of Turkey. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca 2011 May; 39 (2): 105-8.
164. Grison-Pige L, Hossaert-McKey M, Greeff JM, Bessiere JM. Fig volatile compounds- -a first comparative study. Phytochemistry 2002 Sep; 61 (1): 61-71.
165. Wünsch A, Hormaza JI. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica 2002 May; 125 (1): 59-67.
166. Gupta P, Rustgi S. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. Funct Integr Genomics 2004 Apr; 4 (3): 139-62.
167. Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjioudjop MN. An overview of molecular marker methods for plants. Afr J Biotechnol 2006 Dec; 5 (25): 2540-68.

168. Papadopoulou K, Ehaliotis C, Tourna M, Kastanis P, Karydis I, Zervakis G. Genetic relatedness among dioecious *Ficus carica* L. cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis, and evaluation of agronomic and morphological characters. *Genetica* 2002 Jan; 114 (2): 183-94.
169. Smith JSC, Smith OS. Fingerprinting crop varieties. In: Donald LS, editor. *Adv Agron*: Academic Press; 1992. p. 85-140.
170. Pecchioni N, Facciolo P, Monetti A, Stanca AM, Terzi V. Molecular markers for genotype identification in small grain cereals. *Journal of Genetic and Breeding* 1996 Sep; 50: 213-19.
171. Joshi K, Chavan P, Warude D, Patwardhan B. Molecular markers in herbal drug technology. *Curr Sci* 2004 Jul; 87 (2): 159-65.
172. Durham RE, Korban SS. Evidence of gene introgression in apple using RAPD markers. *Euphytica* 1994 Nov; 79 (1): 109-14.
173. Wu SB, Collins G, Sedgley M. A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome* 2004 Feb; 47 (1): 26-35.
174. Lopes MS, Mendonça D, Sefc KM, Gil FS, Machado AC. Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *HortScience* 2004 Dec; 39 (7): 1562-5.
175. Schlotterer C. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nat Rev Genet* 2004 Jan; 5 (1): 63-9.
176. Hammer K, Arrowsmith N, Gladis T. Agrobiodiversity with emphasis on plant genetic resources. *Naturwissenschaften* 2003 Jun; 90 (6): 241-50.
177. Marmiroli N, Peano C, Maestri E. Advanced PCR techniques in identifying food components. In: Lees M, editor. *Food authenticity and traceability*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2003.
178. Lilly JW, Havey MJ, Jackson SA, Jiang J. Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants. *Plant Cell* 2001 Feb; 13 (2): 245-54.
179. Maliga P. Plastid transformation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* 2004 Jun; 55: 289-313.

180. Turkoglu A, Duru ME, Mercan N, Kivrak I, Gezer K. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chem 2007cJan; 101 (1): 267-73.
181. Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. Int J Dev Neurosci 2000 Jul; 18 (4–5): 367-81.
182. Jadhav S, Nimbalkar S, Kulkarni A, Madhavi D. Lipid oxidation in biological and food systems. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunke DK, editors. Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. New York: Marcel Dekker, Inc; 1996. p. 5-65.
183. Halliwell B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. Food Chem Toxicol 1995 Jul; 33 (7): 601-17.
184. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: State of the art. Am J Med 1991 Sep; 91 (3, Supplement 3): S2-S13.
185. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med 2000 Jul; 109 (1): 33-44.
186. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology – terminology and critical thinking. FEBS Lett 2004 Jan; 558 (1–3): 3-6.
187. Ali S, Mann DA. Signal transduction via the NF-kappaB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. Cell Biochem Funct 2004 Mar-Apr; 22 (2): 67-79.
188. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. Toxicol Pathol 2002 Nov; 30 (6): 620-50.
189. Sies H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 1993 Jul; 215 (2): 213-9.
190. Fridovich I. Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), superoxide dismutases and related matters. J Biol Chem 1997 Jul; 272 (30): 18515-7.
191. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Biochem Pharmacol 1995 May; 49 (10): 1341-8.
192. Chen X, Liang H, Van Remmen H, Vijg J, Richardson A. Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. Arch Biochem Biophys 2004 Feb; 422 (2): 197-210.

193. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004 Feb; 44: 239-67.
194. Ferreira F, Ferreira R, Duarte JA. Stress oxidativo e dano oxidativo muscular esquelético: influência do exercício agudo inabitual e do treino físico. *Revista Portuguesa de Ciências Desportivas* 2007; 7 (2): 257-75.
195. Jung MY, Yoon SH, Lee HO, Min DB. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. *J Food Sci* 1998 May; 63 (3): 408-12.
196. Lee KH, Jung MY, Kim SY. Effects of ascorbic acid on the light-induced riboflavin degradation and color changes in milks. *J Agric Food Chem* 1998 Feb; 46 (2): 407-10.
197. Niki E. Lipid antioxidants: how they may act in biological systems. *Br J Cancer Suppl* 1987 Jun; 8: 153-7.
198. Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr J* 2003 Aug; 2: 7.
199. Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1995 Dec; 62 (6): 1322S-6S.
200. Buettner GR, Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiat Res* 1996 May; 145 (5): 532-41.
201. Proteggente AR, Rehman A, Halliwell B, Rice-Evans CA. Potential problems of ascorbate and iron supplementation: pro-oxidant effect *in vivo*? *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Nov; 277 (3): 535-40.
202. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003 Dec; 25 (3-4): 207-18.
203. Martínez-Tomé M, García-Carmona F, Murcia MA. Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. *J Sci Food Agric* 2001 Aug; 81 (10): 1019-26.
204. Pokorny J, Korczak J. Preparation of natural antioxidants. In: Pokorny J, Yanisshlieva N, Gordon M, editors. *Antioxidants in Food*. New York: Woodhead Publishing Ltd, CRC Press; 2001. p. 311-30.

205. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 1998 Jan; 46 (1): 49-53.
206. Wu H-C, Shiau C-H, Chen HM, Chiou T-K. Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acids and their combination. *J Food Drug Anal* 2003 Feb; 11 (2): 148-53.
207. Yong SH, Karel M. Reactions between peroxidizing lipids and histidyl residue analogues: enhancement of lipid oxidation and browning by 4-methylimidazole. *Lipids* 1978 Jan; 13 (1): 1-5.
208. Searle AJ, Wilson RL. Stimulation of microsomal lipid peroxidation by iron and cysteine. Characterization and the role of free radicals. *Biochem J* 1983; 212: 549-54.
209. Decker A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 1997 Nov; 55 (11): 396-8.
210. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov; 854: 435-42.
211. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001 Jul; 21 (1): 381-406.
212. Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci Food Agric* 2000 May; 80 (7): 985-1012.
213. Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 1991 Oct; 42 (9): 1673-81.
214. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 1998 Jan; 61 (1): 71-6.
215. Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 2004 Apr; 36 (7): 838-49.

216. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996 May; 20 (7): 933-56.
217. Natella F, Nardini M, Di Felice M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem* 1999 Apr; 47 (4): 1453-9.
218. Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J* 1998 Mar; 330 (Pt 3): 1173-8.
219. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 2002 Oct; 13 (10): 572-84.
220. Rice-Evans CA. Wake up to flavonoids. London: Royal Society of Medicine Press Limited; 2000.
221. Payá M, Halliwell B, Hoult JR. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992 Jul; 44 (2): 205-14.
222. Foti M, Piattelli M, Baratta MT, Ruberto G. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure-activity relationship. *J Agric Food Chem* 1996 Feb; 44 (2): 497-501.
223. Kaneko T, Baba N, Matsuo M. Protection of coumarins against linoleic acid hydroperoxide-induced cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 2003 Jan; 142 (3): 239-54.
224. Hoult JR, Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol* 1996 Jun; 27 (4): 713-22.
225. Zhang H-Y, Wang L-F. Theoretical elucidation of structure-activity relationship for coumarins to scavenge peroxy radical. *J Mol Struct-THEOCHEM* 2004 Mar; 673 (1-3): 199-202.
226. Cai YZ, Mei S, Jie X, Luo Q, Corke H. Structure-radical scavenging activity relationships of phenolic compounds from traditional Chinese medicinal plants. *Life Sci* 2006 May; 78 (25): 2872-88.
227. Ramesh B, Pugalendi KV. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life Sci* 2006 Jun; 79 (3): 306-10.

228. Gravot A, Larbat R, Hehn A, Lievre K, Gontier E, Goergen JL, et al. Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant-*Ruta graveolens*-exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. Arch Biochem Biophys 2004 Feb; 422 (1): 71-80.
229. Ramadan MF, Mörsel J-T. Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. Eur J Lipid Sci Technol 2004 Jan; 106 (1): 35-43.
230. Kochhar SP. Stabilisation of frying oils with natural antioxidative components. Eur J Lipid Sci Technol 2000 Sep; 102 (8-9): 552-9.
231. Venkatraman JT, Pinnavaia L. Effects of saturated, ω -6 and ω -3 lipids on activities of enzymes involved in antioxidant defense in normal rats. Nutr Res 1998 Feb; 18 (2): 341-50.
232. Benson MK, Devi K. Influence of omega-6/omega-3 rich dietary oils on lipid profile and antioxidant enzymes in normal and stressed rats. Indian J Exp Biol 2009 Feb; 47 (2): 98-103.
233. Jelen H. Food Flavors: Chemical, sensory and technological properties: Taylor & Francis; 2011.
234. Houghton PJ, Ren Y, Howes MJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. Nat Prod Rep 2006 Apr; 23 (2): 181-99.
235. Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor: Nat Rev Neurosci 2001 Apr; 2 (4): 294-302.
236. Katzman R, Saitoh T. Advances in Alzheimer's disease. FASEB J 1991 Mar; 5 (3): 278-86.
237. Krasowski MD, McGehee DS, Moss J. Natural inhibitors of cholinesterases: implications for adverse drug reactions. Can J Anaesth 1997 May; 44 (5 Pt 1): 525-34.
238. Yadav PR. Cell culture: Discovery Publishing House; 2008.
239. Nakayama T. Suppression of Hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. Cancer Res 1994 Apr; 54 (7 Supplement): 1991s-3s.

240. Nakayama T, Hori K, Osawa T, Kawakishi S. Suppression of hydrogen peroxide-induced mammalian cytotoxicity by nordihydroguaiaretic acid. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992 Jul; 56 (7): 1162-3.
241. Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol* 2006 Nov; 72 (11): 1439-52.
242. Fraga CG. Plant polyphenols: how to translate their *in vitro* antioxidant actions to *in vivo* conditions. *IUBMB Life* 2007 Apr-May; 59 (4-5): 308-15.
243. Piao MJ, Kang KA, Zhang R, Ko DO, Wang ZH, You HJ, et al. Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells *via* an antioxidant effect. *Biochim Biophys Acta* 2008 Dec; 12 (57): 15.
244. Chen T-J, Jeng J-Y, Lin C-W, Wu C-Y, Chen Y-C. Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology* 2006 Jun; 223 (1-2): 113-26.
245. Freshney I. Culture of animal cells: A manual of basic technique ;2005.
246. Pinho BR, Sousa C, Valentão P, Andrade PB. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS ONE* 2011 Aug; 6 (8): e24098.
247. Sousa C, Pontes H, Carmo H, Dinis-Oliveira RJ, Valentão P, Andrade PB, et al. Water extracts of *Brassica oleracea* var. *costata* potentiate paraquat toxicity to rat hepatocytes *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 2009 Sep; 23 (6): 1131-8.
248. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988 Mar; 175 (1): 184-91.
249. Costa S, Coelho P, Costa C, Silva S, Mayan O, Santos LS, et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde. *Toxicology* 2008 Aug; 252 (1-3): 40-8.
250. Francis FJ. Wiley Encyclopedia of food science and technology. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 1999.
251. Ong BT, Nazimah SAH, Osman A, Quek SY, Voon YY, Hashim DM, et al. Chemical and flavour changes in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivar J3 during ripening. *Postharvest Biol Tec* 2006 Jun; 40 (3): 279-86.

252. Glew RH, Ayaz FA, Sanz C, VanderJagt DJ, Huang HS, Chuang LT, et al. Changes in sugars, organic acids and amino acids in medlar (*Mespilus germanica* L.) during fruit development and maturation. Food Chem 2003 Nov; 83 (3): 363-9.
253. Hurth MA, Suh SJ, Kretzschmar T, Geis T, Bregante M, Gambale F, et al. Impaired pH homeostasis in Arabidopsis lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. Plant Physiol 2005 Mar; 137 (3): 901-10.
254. Stumpf DK, Burris RH. Organic acid contents of soybean: age and source of nitrogen. Plant Physiol 1981 Nov; 68 (5): 989-91.
255. Scheibe R. Malate valves to balance cellular energy supply. Physiol Plant 2004 Jan; 120 (1): 21-6.
256. Cheynier V, Sarni-Manchado P, Quideau S. Recent advances in polyphenol research: John Wiley & Sons; 2012.
257. Lopez-Millan AF, Morales F, Abadia A, Abadia J. Changes induced by Fe deficiency and Fe resupply in the organic acid metabolism of sugar beet (*Beta vulgaris*) leaves. Physiol Plant 2001 May; 112 (1): 31-8.
258. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother 1972 Jul; 2 (1): 23-8.
259. Walters DR, Walker RL, Walker KC. Lauric acid exhibits antifungal activity against plant pathogenic fungi. Journal of Phytopathology 2003 Apr; 151 (4): 228-30.
260. Zheng CJ, Yoo J-S, Lee T-G, Cho H-Y, Kim Y-H, Kim W-G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. FEBS Lett 2005 Sep; 579 (23): 5157-62.
261. Gould KS, Lister C. Flavonoids functions in plants. In: Andersen ØM, Markham KR, editors. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications. Boca Raton: Florida: CRC, Taylor & Francis; 2006. p. 420.
262. Hoffmann L, Besseau S, Geoffroy P, Ritzenthaler C, Meyer D, Lapierre C, et al. Silencing of hydroxycinnamoyl-coenzyme A shikimate/quinate hydroxycinnamoyltransferase affects phenylpropanoid biosynthesis. The Plant Cell 2004 Jun; 16 (6): 1446-65.

263. McClure JW. Physiological functions of flavonoids. In: Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H, editors. The Flavonoids. London: Chapman and Hall; 1975.
264. Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul JM, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, et al. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol* 2006 Jun; 57: 405-30.
265. Jones P, Vogt T. Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers. *Planta* 2001 Jun; 213 (2): 164-74.
266. Dufourc EJ. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. *Plant Signal Behav* 2008 Feb; 3 (2): 133-4.
267. Wood PJ, Siddiqui IR. Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity. *Anal Biochem* 1971 Feb; 39 (2): 418-28.
268. Fidler JC. The metabolism of acetaldehyde by plant tissues. *J Exp Bot* 1968 Feb; 19 (1): 41-51.
269. Pesis E. The role of the anaerobic metabolites, acetaldehyde and ethanol, in fruit ripening, enhancement of fruit quality and fruit deterioration. *Postharvest Biol Tec* 2005 Jul; 37 (1): 1-19.
270. Cossins EA. Ethanol metabolism in plants. In: Hook DD, Crawford RMM, editors. Plant life in anaerobic environments: Ann Arbor Science Publishers; 1978. p. 169-202.
271. Abascal K, Ganora L, Yarnell E. The effect of freeze-drying and its implications for botanical medicine: a review. *Phytother Res* 2005 Aug; 19 (8): 655-60.
272. Yoo YH, Lee S, Kim Y, Kim KO, Kim YS, Yoo SH. Functional characterization of the gels prepared with pectin methylesterase (PME)-treated pectins. *Int J Biol Macromol* 2009 Oct; 45 (3): 226-30.
273. Navia-Giné WG, Gomez SK, Yuan J, Chen F, Korth KL. Insect-induced gene expression at the core of volatile terpene release in *Medicago truncatula*. *Plant Signaling & Behavior* 2009 Jul; 4 (7): 636-8.
274. Turlings TCJ, Tumlinson JH, Lewis WJ. Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science* 1990 Nov; 250 (4985): 1251-3.

275. Schnee C, Kollner TG, Held M, Turlings TC, Gershenzon J, Degenhardt J. The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 Jan; 103 (4): 1129-34.
276. Yamasaki Y, Kunoh H, Yamamoto H, Akimitsu K. Biological roles of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. *J Gen Plant Pathol* 2007 Jun; 73 (3): 168-79.
277. Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, et al. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Ann Mo Bot Gard* 1993 May; 80 (3): 528-80.
278. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005 Oct; 360 (1462): 1889-95.
279. Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 Jun; 102 (23): 8369-74.
280. Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS ONE* 2007 Jun; 2 (6): e508.
281. Proença da Cunha A, Cavaleiro C, Salgueiro L. Fármacos aromáticos: plantas aromáticas e óleos essenciais. In: Proença da Cunha A, editor. *Fitoquímica e Farmacognosia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2005. p. 341-401.
282. Abdalla AE, Roozen JP. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chem* 1999 Feb; 64 (3): 323-9.
283. Philip M. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004 Feb; 26 (2): 211-9.
284. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971 Oct; 44 (1): 276-87.
285. Chen Y, Zheng R, Jia Z, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1990 Jan; 9 (1): 19-21.

286. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007 Jan; 87 (1): 315-424.
287. Burney S, Caulfield JL, Niles JC, Wishnok JS, Tannenbaum SR. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res* 1999 Mar; 424 (1-2): 37-49.
288. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007 May; 851 (1-2): 51-70.
289. Saija A, Tomaino A, Cascio RL, Trombetta D, Proteggente A, De Pasquale A, et al. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J Sci Food Agric* 1999 Mar; 79 (3): 476-80.
290. Vanacker SABE, Tromp MNJL, Haenen GRMM, Vandervijgh WJF, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 Sep; 214 (3): 755-9.
291. Chai PC, Long LH, Halliwell B. Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 May; 304 (4): 650-4.
292. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett* 2003 Apr; 540 (1-3): 3-6.
293. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983 Dec; 65 (1-2): 55-63.
294. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987 Sep; 56 (3): 279-85.
295. Lobner D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? *J Neurosci Methods* 2000 Mar; 96 (2): 147-52.
296. Kagan VE, Tyurina YY. Recycling and redox cycling of phenolic antioxidants. *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov; 854: 425-34.
297. Miller R, James-Kracke M, Sun G, Sun A. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's Disease. *Neurochem Res* 2009 Mar; 34 (1): 55-65.

298. Sterner O. Chemistry, health and environment. 2nd ed. Lund: John Wiley & Sons; 2010.
299. Kocsis A, Molnar H. Genotoxicity: Evaluation, Testing and Prediction. 1st ed. New York: Nova Science Pub Inc; 2009.
300. Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kawanishi M, Kawanishi S. Mechanism for generation of hydrogen peroxide and change of mitochondrial membrane potential during rotenone-induced apoptosis. Life Sci 2003 Nov; 73 (25): 3277-88.
301. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine 2007 Apr; 14 (4): 289-300.
302. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol 1961 Jul; 7: 88-95.
303. Brühlmann C, Marston A, Hostettmann K, Carrupt P-A, Testa B. Screening of non-alkaloidal natural compounds as acetylcholinesterase inhibitors. Chem Biodiversity 2004 Jun; 1 (6): 819-29.
304. Burt SA, Reinders RD. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett Appl Microbiol 2003 Mar; 36 (3): 162-7.
305. Chorianopoulos NG, Giaouris ED, Skandamis PN, Haroutounian SA, Nychas GJ. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. J Appl Microbiol 2008 Jun; 104 (6): 1586-96.
306. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents 2005 Nov; 26 (5): 343-56.

